



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Ο ρόλος των καλπαϊνών 1 & 2 στην πώρωση
κατάγματος μακρών οστών επίμυος»*

ΣΤΑΜΟΥΛΗ ΛΕΜΟΝΙΑ



ΛΑΡΙΣΑ, 2015

*«Ο ρόλος των καλπαϊνών 1 & 2 στην πώρωση κατάγματος
μακρών οστών επίμυος»*

*«The role of calpain1 and calpain2 proteins in the fracture
healing of rat long bones»*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	
Θεολογία Σαραφίδου	Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ζήσης Μαμούρης	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ζαφειρούλα Ιακωβίδου - Κρίτση	Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας και Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της κ. Θεολογίας Σαραφίδου, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε, τη βοήθεια και τη συνεργασία της.

Ιδιαίτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου τους καθηγητές, κ. Ζαφειρούλα Ικωβίδου-Κρίση , τον κ. Ζήση Μαμούρη.

Επίσης ιδιαίτερα σημαντική ήταν η βοήθεια για την πραγματοποίηση της πτυχιακής μου εργασίας του κ. Ιωάννη Βασιλόπουλου, της Ελένης Γαλλιοπούλου και του Θέμη Γιαννούλη και τους ευχαριστώ ειλικρινά για αυτό.

Καθώς, την Κωνσταντίνα Σαρρή και την Κώστα Σταμάτη για την παρουσία και τη συμβολή τους στο εργαστήριο.

Τέλος, την οικογένεια και τους φίλους μου για όλα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι καλπαΐνες αποτελούν μια οικογένεια υψηλά συντηρημένων πρωτεασών κυστεΐνης που ενεργοποιούνται μετά από σύνδεση με ιόντα ασβεστίου (ασβεστιοεξαρτώμενες). Πρωτεάσες παρόμοιες με τις καλπαΐνες (Calpain-like proteases) έχουν εντοπιστεί σε μεγάλο εύρος οργανισμών και συμμετέχουν σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες διαδραματίζοντας ένα πολύ σημαντικό ρόλο ως ρυθμιστές πολλών ενδοκυτταρικών μορίων και μονοπατιών. Όσον αφορά στον οστικό ιστό, συμβάλλουν στη ρύθμιση της οστικής ανακατασκευής μέσω της ρύθμισης της ισορροπίας οστεοβλαστών/οστεοκλαστών, συνεπώς στη διαμόρφωση της οστικής πυκνότητας. Το γεγονός αυτό υποδυναμίζει τη συσχέτισή τους με παθολογικές καταστάσεις μεταβολισμού των οστών, όπως π.χ. η οστεοπόρωση.

Στην παρούσα μελέτη, με βάση το ρόλο των καλπαϊνών, μελετήθηκε η πιθανή συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των καλπαϊνών 1 & 2 στην πώρωση κατάγματος μακρών οστών επίμυος.

Ειδικότερα, απομονώθηκαν οι ολικές πρωτεΐνες από μακρά οστά επίμυων με ή χωρίς κάταγμα σε διαφορετικούς χρόνους μετά την πρόκληση του κατάγματος. Η μελέτη αφορούσε τόσο ανήλικους όσο και ενήλικους επίμυες. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης των καλπαϊνών πραγματοποιήθηκε με ELISA.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των καλπαϊνών 1 & 2, τουλάχιστον για τους συγκεκριμένους χρόνους που μελετήθηκαν. Περισσότερες χρονικές στιγμές, μετά το κάταγμα καθώς και μεγαλύτερος αριθμός επίμυων για να μειωθεί το μεγάλο εύρος της τυπικής απόκλισης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την κατανόηση της δράσης των καλπαϊνών στην πώρωση καταγμάτων.

ABSTRACT

The calpain super-family consists of a number of highly conserved cysteine proteases that are activated after binding to calcium ions (calcium-dependent). Proteases similar to calpains (Calpain-like proteases) have been identified in a wide range of organisms and are involved in various cellular functions having a very important role in modulating many intracellular molecules and pathways.

When it comes to the bone tissue, the calpain system seems to participate in the process of bone remodelling by regulating the equilibrium between osteoblasts and osteoclasts, thus the construction of bone density, something that also indicates their correlation with pathological conditions in bone metabolism, such as osteoporosis.

In this study, we investigated the existence of a possible association between the expression levels of calpain 1 & 2 in fracture healing of mice long bones.

In detail, we isolated the total protein from the long bones of mice (both immature and mature) with or without fracture at different times after the induction of the fracture. The estimation of the concentration of calpain in each sample was performed by ELISA.

Analysis of the results showed no statistical difference between the levels of expression of calpain 1 and 2, at least for specific time-points we have studied. By adding more time-points and larger numbers of mice, in order to reduce the wide variation in standard deviation, it may be useful in understanding of calpain's activity and role in healing fractures.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το σύστημα των καλπαϊνών.....	1
1.1.1 Σύντομη ιστορική αναδρομή.....	2
1.1.2 Δομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των καλπαϊνών.....	3
1.1.3 Κατηγοριοποίηση των καλπαϊνών βάσει ενεργοποιητικής συγκέντρωσης ασβεστίου, δομής και προτύπου έκφρασης.....	4
1.1.4 Ενεργοποίηση των ετεροδιμερών καλπαΐνης.....	7
1.1.5 Αναστολή των καλπαϊνών – καλπαστατίνη.....	8
1.1.6 Οι καλπαΐνες στον οστίτη ιστό.....	9
1.2 Ο οστίτης ιστός και ο ρόλος των καλπαϊνών στην ανακατασκευή του.....	9
1.2.1 Δομή και φυσιολογία του οστίτη ιστού – μακροσκοπική κατασκευή.....	10
1.2.2 Δομή και φυσιολογία οστίτη ιστού - μικροσκοπική κατασκευή.....	12
1.2.3 Ισορροπία οστεοβλαστών/οστεοκλαστών και οστική ανακατασκευή.....	20
1.2.4 Διαταραχή ισορροπίας οστεοβλαστών/οστεοκλαστών – οστεοπόρωση.....	27
1.2.5 Ο ρόλος του συστήματος RANKL/RANK/OPG στην ισορροπία οστεοβλαστών/οστεοκλαστών.....	31
1.2.6 Ο ρόλος των καλπαϊνών στην ισορροπία οστεοβλαστών/οστεοκλαστών.....	31

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ.....	33
2.1.1 Πρωτόκολλο Απομόνωσης Πρωτεϊνών Από Οστίτη Ιστό	34
2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	35
2.2.1 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών.....	36

2.2.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών Σε Αποδιατακτικό Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης (Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis- Sds-Page).....	37
2.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD.....	43
2.3.1 Δημιουργία Πρότυπης Καμπύλης.....	43
2.3.2 Προετοιμασία Δειγμάτων.....	44
2.4 Η ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Ενζυμική Ανοσοπροσροφητική Ανάλυση)	45
2.4.1 Αρχή Της Μεθόδου.....	45
2.4.2 Οι Βασικές Κατηγορίες Elisa.....	46
2.5 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΣΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ.....	51
2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	51
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΟΣΤΑ ΕΠΙΜΥΩΝ.....	52
3.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD.....	53
3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΚΑΛΠΑΪΝΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ELISA.....	54
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
4.1 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	59
4.2 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	59
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΚΑΛΠΑΪΝΩΝ

Εισαγωγικά στοιχεία

Πρόκειται για ένα αρκετά έως πολύ συντηρημένο σύστημα ασβεστιο-εξαρτώμενων πρωτεασών κυστεΐνης, της οικογένειας C2 (EC 3.4.22.17; Clan CA, family C02) (Sorimachi H., et al, 2011). Ενεργοποιούνται από ασβέστιο και αναστέλλονται από την καλπαστατίνη. Αποτελούν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, όμως τελευταία παρατηρήθηκε και εντοπισμός τους σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά οργανίδια (Goll D.E., et al, 2003).

Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν εντοπιστεί σε πληθώρα οργανισμών. Πρωτεάσες παρόμοιες με τις καλπαΐνες (Calpain-like proteases) έχουν εντοπιστεί σε κατώτερους ευκαρυώτες, μύκητες, φυτά και σε ανώτερους ευκαρυώτες, από τη *D. melanogaster* έως τα θηλαστικά, στην πλειοψηφία των ιστών και οργάνων τους. Ενδεικτικά, υπάρχουν αναφορές ύπαρξής τους στις εμμύελες ίνες του κεντρικού νευρικού συστήματος, στο νωτιαίο μυελό, τον εγκέφαλο, το ήπαρ, τα νεφρά, τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τους σκελετικούς και στον καρδιακό μυ (Goll D.E., et al, 2003). Αναλυτική μελέτη της ευαισθησίας (δηλ. της ενεργοποιητικής συγκέντρωσης ασβεστίου) των καλπαϊνών των διάφορων ιστών, έδειξε ότι οι ιστοί με τη μεγαλύτερη ευαισθησία είναι οι μύες, η καρδιά και τα νεφρά, ακολουθεί το ήπαρ (1/3 των προηγούμενων) ενώ τη μικρότερη ευαισθησία παρουσιάζει ο εγκέφαλος (Sorimachi H., et al, 2011).

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν προσδιοριστεί 15 παράλογα γονίδια (*CAPN1-3, 5-16*) τα οποία κωδικοποιούν πρωτεάσες παρόμοιες με την καλπαΐνη [calpain-like proteases (CysPcs)]. Η πρωτεΐνη CAPN1 είναι συντηρημένη, παρουσιάζοντας έως και 98% ομοιότητα με τις αντίστοιχες των άλλων σπονδυλωτών. Αυτό το υψηλό ποσοστό συντήρησης αρχικά οδήγησε στην υπόθεση ότι επρόκειτο για πρωτεΐνες γενικών καθηκόντων (housekeeping proteins), πλέον όμως έχει δειχθεί η συμμετοχή τους σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική αύξηση και διαίρεση, η κυτταρική διαφοροποίηση, η απόπτωση κ.λπ. γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι πρωτεάσες αυτές καταλύουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο και ως καταβολικοί ρυθμιστές πολλών ενδοκυτταρικών μορίων (Sorimachi H., et al 2011).

1.1.1 Σύντομη ιστορική αναδρομή

Οι πρώτες πληροφορίες που έχουμε για τις καλπαΐνες χρονολογούνται στο 1964, όταν ο Gordon Guroff (Guroff, 1964) ανακάλυψε ένα «νέο ασβέστιο-εξαρτώμενο μόριο» στον εγκέφαλο αρουραίου. Την ίδια χρονιά, οι Meyer, Fischer και Krebs (Krebs E.G., et al, 1964) εντόπισαν ένα παράγοντα υπεύθυνο για την ασβέστιο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της κινάσης φωσφορυλάσης στο σκελετικό μυ λαγού, και υπέθεσαν -ορθώς- ότι επρόκειτο για μία πρωτεάση που ενεργοποιείται από ασβέστιο. Ονόμασαν τον παράγοντα αυτό KAF (kinase-activating factor) και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτό το πρωτεολυτικό ένζυμο παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Στο ερώτημα του Guroff, τι είναι και τι κάνουν τα πρωτεολυτικά ένζυμα στον εγκέφαλο και ποιά είναι η σχέση τους με άλλων ειδών γνωστές πρωτεάσες, οι Krebs & Huston (1968) εντόπισαν έναν ασβεστιο-εξαρτώμενο πρωτεολυτικό παράγοντα σε ιστό καρδιακού μυ. Το 1976 πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά απομόνωση της πρωτεΐνης αυτής ενώ το 1978, η ομάδα του Kazutomo Imahori απομόνωσε καλπαΐνες από όρνιθα και ονόμασε την ομοιογενή αυτή ομάδα πρωτεϊνών CAPN (calcium-activated neutral protease). Την ίδια χρονιά, ο Takashi Murachi ανακαλύπτει έναν πολύ ειδικό ενδογενή αναστολέα των CAPN, την σήμερα γνωστή ως καλπαστατίνη. Το 1984, ο Koichi Suzuki δημοσίευσε την ολοκληρωμένη πρωτοταγή δομή του καταλυτικού κέντρου των CAPN.

Από τότε, υπήρξε μεγάλο ενδιαφέρον για τη μελέτη των πρωτεϊνών αυτών και σύντομα οι εν λόγω πρωτεΐνες εδραιώθηκαν ως βασικής λειτουργίας μόρια στα κύτταρα. Για πάνω από δέκα χρόνια, αναφέρεται στα βιβλία εκτενώς αυτή ομάδα ασβέστιο-εξαρτωμένων πρωτεϊνών με διαφορετικά ονόματα (CANP, CASF, CDP, KAF). Αυτό το πρόβλημα λύθηκε το 1990 από τους Suzuki και Imahori. Τότε, στο 8^ο διεθνές συνέδριο για την πρωτεόλυση και την ανακύκλωση πρωτεϊνών (International Conference on Proteolysis and Protein Turnover), ο όρος *'calpains'* έγινε η επίσημη ονομασία αυτών των πρωτεϊνών. Η ονομασία calpain είναι συντομογραφία του calcium (του απαραίτητου για την ενεργοποίησή τους ασβεστίου) και της ομόλογης πρωτεΐνης parain (πρόκειται για μια αρκετά μελετημένη πρωτεάση κυστεΐνης της οικογένειας C1, που απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό παπάγια). Από το

1999 αρχίζουν να εμφανίζονται τα πρώτα πλήρη άρθρα-μελέτες για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες μελετώνται μέχρι σήμερα με μεγάλο ενδιαφέρον.

1.1.2 Δομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των καλπαϊνών

Το πρωτεολυτικό σύστημα των καλπαϊνών αποτελείται από (Goll D.E., et al, 2003)

- i. Την πρωτεάση
- ii. Τον ενδογενή αναστολέα της (κυρίως την καλπαστατίνη που είναι ο ειδικός ενδογενής αναστολέας της, καθώς και κάποιους ανταγωνιστικούς προσδέτες της καλμοδουλίνης)
- iii. Τον ενδογενή ενεργοποιητή τους (μεμβρανικά φωσφολιπίδια ή παράγωγα αμινοξέων)

Αρχικά θεωρήθηκε ότι η δραστικότητα των πρωτεασών αυτών αφορά ένα μόνο ένζυμο, το οποίο ενεργοποιείται σε υψηλή συγκέντρωση Ca^{2+} (της τάξης των mM) (Reville W.J., et al, 1976), όμως αργότερα αποδείχθηκε και η ύπαρξη ενός δεύτερου ενζύμου, σε πληθώρα εκχυλίσμάτων ιστών και οργάνων (Dayton W.R., et al, 1981, Dayton W.R. & Schollmeyer J.V., 1981, Kishimoto A., et al, 1981, Yoshimura N., et al, 1984) το οποίο εμφάνιζε πανομοιότυπες καταλυτικές ιδιότητες με το πρώτο, με μία μεγάλη όμως διαφορά στην απαραίτητη για την ενεργοποίησή του συγκέντρωση Ca^{2+} (της τάξης των μM).

Σήμερα, οι πρωτεάσες αυτές κατατάσσονται σε δύο ευρείες κατηγορίες: τις (i) m-calpain, και (ii) μ -calpain, ως αντιστοιχία των συγκεντρώσεων ασβεστίου (mM και μM) αντίστοιχα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Κατηγορίες καλπαϊνών βάσει της συγκέντρωσης ασβεστίου που απαιτείται για την ενεργοποίηση στο 50% της μέγιστης δραστικότητάς τους (Dayton W.R., 1982).

Τύπος πρωτεάσης	$[\text{Ca}^{2+}]$ for Half-maximal Activity
m-calpain	400-800 mM
μ -calpain	30-50 μM

1.1.3 Κατηγοριοποίηση των καλπαϊνών βάσει ενεργοποιητικής συγκέντρωσης ασβεστίου, δομής και προτύπου έκφρασης

Στους περισσότερους τύπους κυττάρων εντοπίζονται και οι δύο κατηγορίες καλπαϊνών μ και m . Τα μόριά τους είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από δύο υπομονάδες. Μία μεγάλη, η οποία περιλαμβάνει και το καταλυτικό κέντρο της πρωτεάσης (καταλυτική υπομονάδα) μεγέθους ~80kDa και μία μικρή (ρυθμιστική υπομονάδα) μεγέθους ~30kDa.

☛ Οι **ομοιότητες** μεταξύ των m - και μ -καλπαϊνών είναι (Goll D.E., et al, 2003):

- Έχουν παρόμοιο μοριακό βάρος (~100kDa)
- Έχουν την ίδια μικρή υπομονάδα σε κάθε οργανισμό
- Και οι δύο κατηγορίες είναι ενεργές *invitro* σε ουδέτερο pH μόνο παρουσία αντιδραστηρίων όπως μερκαπταιθανόλη και διθειοθρεϊτόλη. Αντίθετα, τα ένζυμα είναι ανενεργά παρουσία αντιδραστηρίων ικανών να τροποποιούν τις θειολικές ομάδες και να δεσμεύουν ιόντα ασβεστίου
- Παρουσιάζουν βέλτιστη ενεργότητα σε pH 7,2-8,2
- Συνδέονται μη ειδικά με καζεΐνη
- Οι υπομονάδες αποχωρίζονται εύκολα
- Αυτοπρωτεολύονται παρουσία ασβεστίου
- Η καλπαστατίνη αναστέλλει ειδικά και τις δύο κατηγορίες καλπαϊνών, ενώ δεν έχει ταυτοποιηθεί ανασταλτική δράση της για άλλες πρωτεάσες

☛ Οι **διαφορές** μεταξύ των m - και μ - καλπαϊνών είναι (Goll D.E., et al, 2003):

- Ενεργοποιούνται με διαφορετική συγκέντρωση ασβεστίου
- Παρουσιάζουν διαφορετικό ισοηλεκτρικό σημείο
- Συνδέονται στην καζεΐνη με διαφορετική αναλογία μορίων
- Παρουσιάζουν διαφορετική ανθεκτικότητα στη θερμότητα (οι μ -calpains είναι πιο ανθεκτικές)
- Εκφράζονται σε διαφορετικά είδη κυττάρων, ενώ στα κύτταρα που εκφράζονται και οι δύο διαφέρει η στοιχειομετρία τους

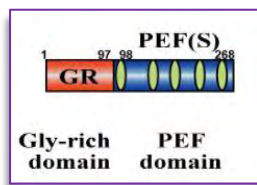
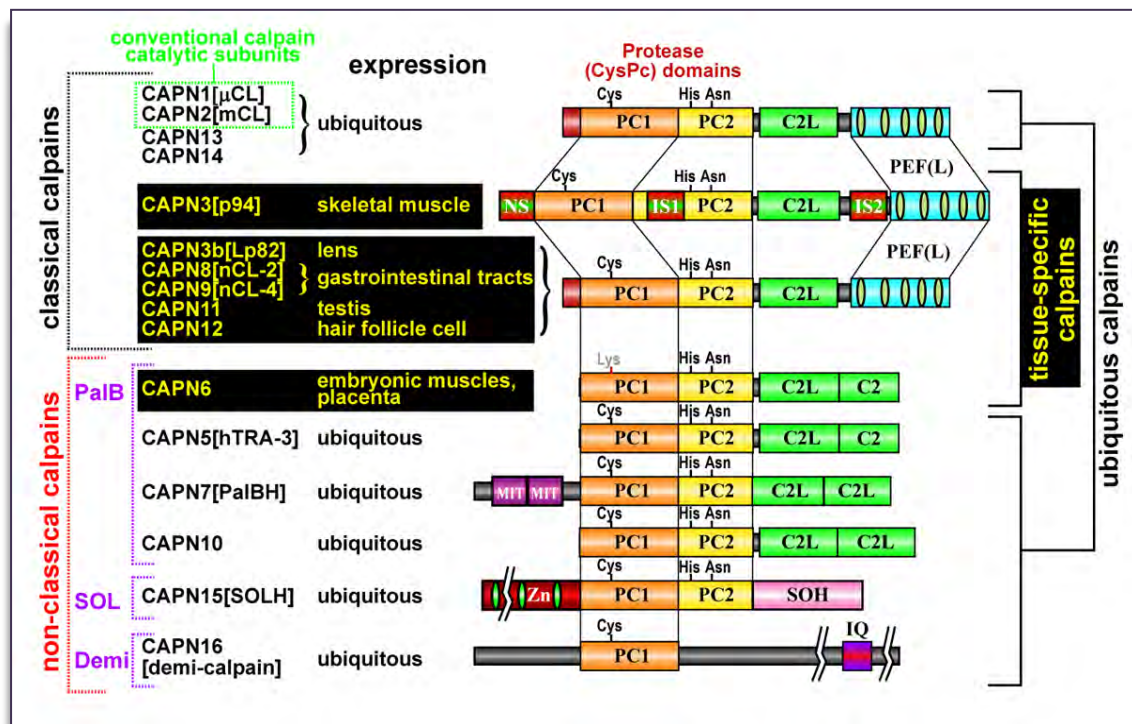
- Συνήθως η μεγάλη υπομονάδα της μ -calpain είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της m -calpain
- Το μέγεθος της μικρής υπομονάδας ανάμεσα στους διάφορους οργανισμούς κυμαίνεται από 28,100 έως 28,235 kDa. Δεν έχει παρατηρηθεί εναλλακτική συρραφή, τουλάχιστον για τη μικρή υπομονάδα
- Έχουν διαφορετική ευαισθησία σε άλλα δισθενή ιόντα εκτός του ασβεστίου (π.χ. η μ -calpain είναι αρκετά ευαίσθητη στο Sr^{2+} και στο Ba^{2+})

Μία εναλλακτική κατηγοριοποίηση των καλπαϊνών βασίζεται στη δομή των λειτουργικών περιοχών των μεγάλων υπομονάδων τους. Έτσι διακρίνονται σε κλασσικές και μη κλασσικές καλπαΐνες. Συγκεκριμένα, στον όρο κλασσικές καλπαΐνες περιλαμβάνονται εκείνες που εμφανίζουν μια περιοχή με δράση όμοια της καλμοδουλίνης στο καρβοξυτελικό άκρο τους (περιοχή PEF στην Εικόνα 1) ενώ εκείνες που στερούνται τέτοιας περιοχής κατατάσσονται στις “μη κλασσικές” (Croall & Ersfeld, 2007) (Εικόνα 1).

Τέλος, ένας επιπλέον διαχωρισμός των εν λόγω πρωτεασών γίνεται βάσει του προτύπου έκφρασής τους. Ειδικότερα, οι καλπαΐνες διακρίνονται σε αυτές που εκφράζονται σε όλους τους ιστούς (ubiquitous) και στις ιστοειδικές [non ubiquitous ή new calpains (n-calpains)] (Saido et al, 1994).

Σήμερα, έχοντας στη διάθεσή μας πληθώρα πληροφοριών (π.χ. την αμινοξική αλληλουχία, τη γονιδιακή έκφραση, τη ρύθμιση και δομή πολλών ισομορφών καθώς και δεδομένα από κρυσταλλογραφία) είναι πλέον αποδεκτή η κατηγοριοποίηση των καλπαϊνών (όπως προτάθηκε από τους Suzuki et al, 1995 και Sorimachi H., et al, 1997), (Εικόνα 1).

Όσον αφορά τη μικρή υπομονάδα των καλπαϊνών (Εικόνα 1), αυτή περιέχει δύο περιοχές, α) την περιοχή VI που είναι ομόλογη της περιοχής IV της μεγάλης υπομονάδας και παίζει ρόλο στη σύζευξη των δύο υπομονάδων και β) την περιοχή V στο αμινοτελικό της άκρο που είναι πλούσια σε γλυκίνη, γεγονός που προσδίδει υδροφοβικότητα στο μόριο, επιτρέποντας τη σύνδεση της υπομονάδας με τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών. Οι περιοχές VI και V ενώνονται μεταξύ τους μέσω μιας περιοχής πλούσιας σε προλίνη (Sorimachi H., et al, 2011).



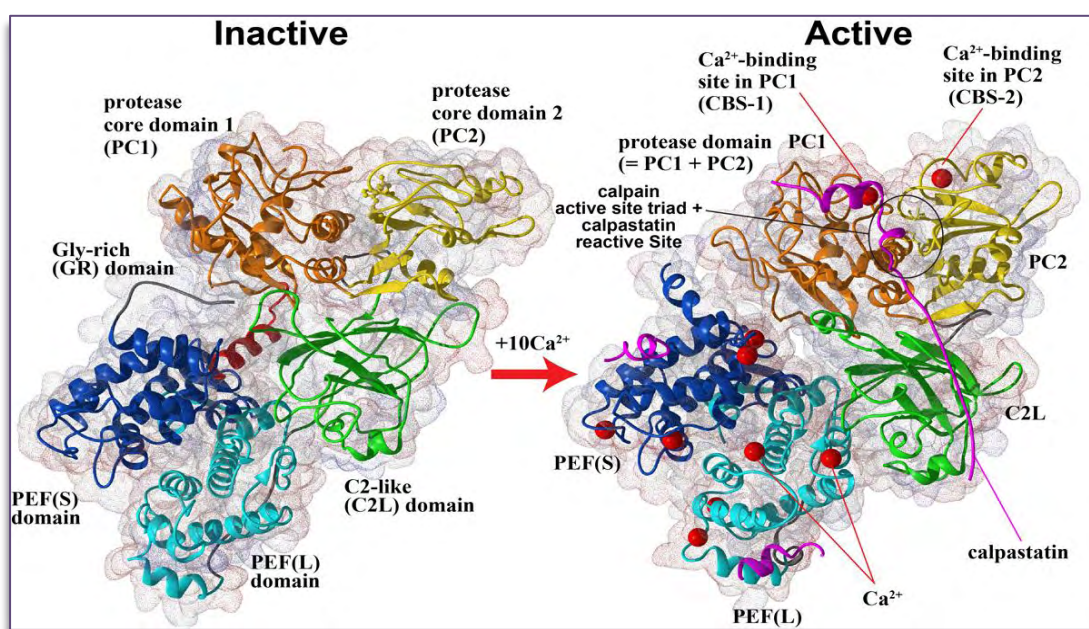
Μεγάλη υπομονάδα

Μικρή υπομονάδα

Εικόνα 1: Κατηγοριοποίηση των καλπαϊνών βάσει δομήστης μεγάλης υπομονάδας τους και του προτύπου έκφρασής τους. Οι κλασσικές καλπαΐνες (classical calpains) διαφοροποιούνται από τις μη κλασσικές επειδή περιέχουν την περιοχή PEF (περιοχή που δεσμεύει ασβέστιο, ομοιάζει με αντίστοιχη περιοχή της καλμοδουλίνης και περιλαμβάνει 5 περιοχές EF-hand). Φαίνονται επίσης οι συντηρημένες περιοχές PC1 and PC2 (οι οποίες συνδυαστικά ονομάζονται CysPc) που γενικά υπάρχουν στις πρωτεάσες κυστεΐνης. Η περιοχή C2L υπάρχει τόσο στις κλασσικές όσο και στις μη κλασσικές καλπαΐνες και ρυθμίζει την ενεργότητα της καλπαΐνης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με άλλες περιοχές π.χ. με τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια. Οι μη κλασσικές καλπαΐνες, οι οποίες δεν είναι όλες ασβεστιο-εξαρτώμενες, έχουν 30-75% ομολογία μεταξύ τους σε αμινοξικό επίπεδο και μπορεί να περιέχουν επιπλέον λειτουργικές περιοχές (π.χ. την περιοχή Zn-δάκτυλος ψευδαργύρου) (τροποποιημένο από Croalland & Ersfeld, 2007).

1.1.4 Ενεργοποίηση των ετεροδιμερών καλπαΐνης

Η ενεργοποίηση των ετεροδιμερών καλπαΐνης απαιτεί υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου, σε σχέση με άλλα ένζυμα, το οποίο συνάδει και με τη δομή των πρωτεϊνών, που είναι πλούσιες σε περιοχές δέσμευσης ασβεστικοκατιόντων. Απουσία ασβεστίου, οι δύο υπομονάδες είναι ισχυρά συνδεδεμένες μεταξύ τους, γεγονός που οδηγεί σε κυκλική διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Η διαμόρφωση αυτή οδηγεί το κατάλοιπο κυστεΐνης, το οποίο είναι απαραίτητο για τη δράση της πρωτεΐνης, στην περιοχή PC1 (Εικόνα 2) άραπροστατευμένο στο εσωτερικό του μορίου και συνεπώς ανενεργό. Παρουσία της απαιτούμενης ποσότητας ασβεστίου συμβαίνουν δομικές αλλαγές και ενεργοποιούν το μόριο (Εικόνα 2).

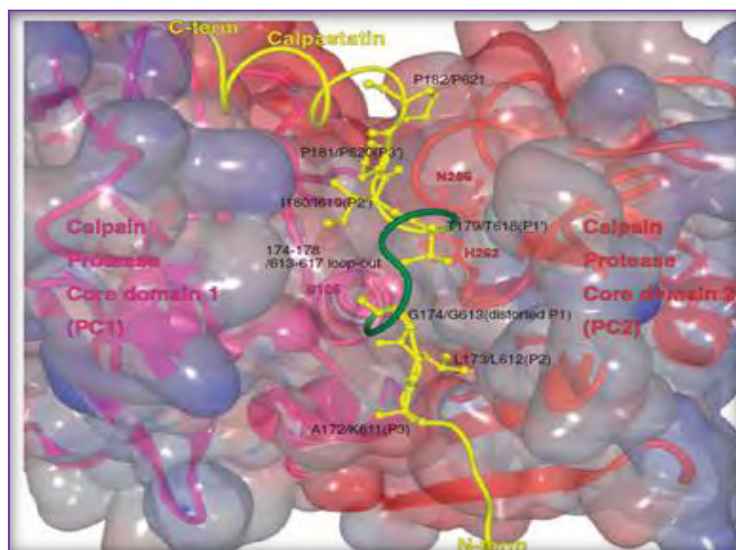


Εικόνα 2: Τρισδιάστατη απεικόνιση ανενεργής και ενεργής m-calpain (CAPN2). Με κόκκινες κουκίδες απεικονίζονται τα ιόντα ασβεστίου συνδεδεμένα στις κατάλληλες περιοχές δέσμευσης (PEF). Το ενεργό κέντρο αποκαλύπτεται μετά από τις αλλαγές που επιφέρει η σύνδεση αυτή στη δομή του μορίου. Το κατάλοιπο κυστεΐνης στην περιοχή PC1 πλησιάζει την ιστιδίνη στην πρωτεΐνη-στόχο και η πρωτεολυτική διαδικασία ξεκινά. Η κυστεΐνη και η ιστιδίνη ενώνονται με δεσμό υδρογόνου. Η ιστιδίνη έλκει το πρωτόνιο της κυστεΐνης η οποία αποκτά ισχυρά πυρηνόφιλο χαρακτήρα. Σχηματίζεται ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Γίνεται πυρηνόφιλη υποκατάσταση με σχηματισμό ενός εστερικού δεσμού στη σερίνη (Goll D.E., et al, 2003).

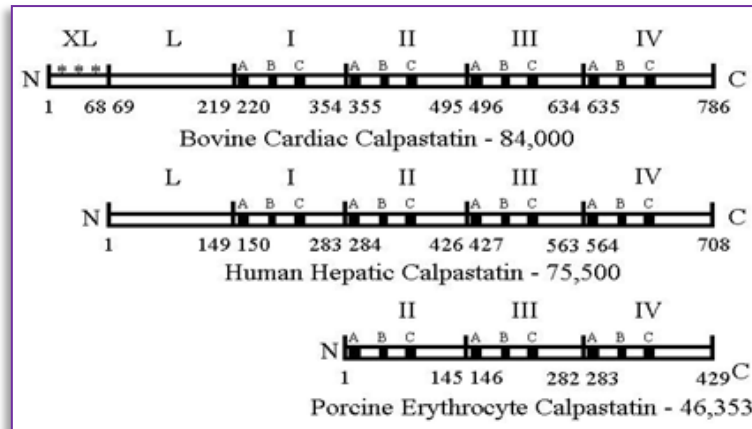
1.1.5 Αναστολή των καλπαϊνών – Καλπαστατίνη

Ο ενδογενής φυσικός αναστολέας της καλπαΐνης είναι η καλπαστατίνη. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους Waxman και Krebs (1978) από τον καρδιακό μυ βοδιού και σε επόμενες έρευνες αποδείχθηκε η αλληλεπίδρασή της με τις καλπαΐνες σε όλους τους ιστούς. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη μεγέθους ~42kDa (Murachi T., 1989) που έχει μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με τις καλπαΐνες όταν αυτές βρίσκονται συνδεδεμένες με ασβέστιο (Εικόνα 3). Συνεπώς και η σύνδεση καλπαστατίνης-καλπαΐνης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ασβεστίου (Karrprell&Goll, 1989). Με την αποδέσμευση ασβεστίου-καλπαΐνης, πραγματοποιείται άμεση αποδέσμευση και της καλπαστατίνης. Το μεγαλύτερο ποσοστό της καλπαστατίνης βρίσκεται ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα και σε ποσοστό ~25% συνδεδεμένο με κυτταρικές μεμβράνες (Melloni et al, 1989).

Μελέτες ανάλυσης της αλληλουχίας και της δομής της καλπαστατίνης έδειξαν ότι το μόριο περιλαμβάνει 4 ομόλογες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (περιοχές I έως IV) και την περιοχή L στο αμινιτελικό άκρο της (Εικόνα 4).



Εικόνα 3: Τρισδιάστατη απεικόνιση της ειδικής σύνδεσης καλπαστατίνης (κίτρινο) με το ενεργό κέντρο της καλπαΐνης, στις δομές PC1 και PC2 (Sorimachi H., et al, 2011).



Εικόνα 4: Δομή της καλπαστατίνης σε βοοειδή, άνθρωπο και χοίρο. Η πρωτεΐνες εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης ιδιαίτερα στις περιοχές I-IV (Goll D.E., et al, 2003).

1.1.6 Οι καλπαΐνες στον οστίτη ιστό

Η στενή αλληλεπίδραση των καλπαϊνών με το ασβέστιο, συνδυαζόμενη με το γεγονός ότι τα οστά είναι η βασική αποθήκη ασβεστίου στον οργανισμό, οδήγησαν σε έρευνες για την ανίχνευση πιθανής σύνδεσης της δράσης των πρωτεασών αυτών με τις λειτουργίες του οστίτη ιστού. Φαίνεται να υπάρχει ένα αξιοσημείωτο ποσοστό συνεργασίας μεταξύ τους για την εξυπηρέτηση δομικών αναγκών του οργανισμού, όπως θα αναλυθεί στα επόμενα εδάφια.

1.2 Ο οστίτης ιστός και ο ρόλος των καλπαϊνών στην ανακατασκευή του

Ο οστίτης ιστός είναι ένας ζωτικής σημασίας ιστός που απαντάται στα θηλαστικά και όχι μόνο. Μεγαλώνει παράλληλα με το ζώο, επιτρέποντάς του να αυξάνει το μέγεθός του. Κύρια λειτουργία του είναι η μηχανική στήριξη του σώματος. Αποτελεί το σημείο πρόσδεσης των μυών στα οστά και, λόγω της σκληρότητας και της αντοχής του, παρέχει προστασία σε ζωτικά όργανα (εγκέφαλος, καρδιά, πνεύμονες). Συμμετέχει στην αιμοποίηση, δημιουργώντας λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια. Τέλος, τα κύτταρα του οστίτη ιστού είναι ζωντανά κύτταρα που συμβάλλουν σημαντικά στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού, καθώς λειτουργούν ως δεξαμενές στοιχείων και ιόντων (ιδιαίτερα ασβεστίου και φωσφόρου) όταν αυτά είναι απαραίτητα σε άλλα όργανα. (Slack 2007, Drake 2010)

Τα οστά διακρίνονται για την συνεχή διαδικασία αυτοανανέωσής τους. Οι ιστοί αναρροφώνται και αναπληρώνονται σε μια χωρικά και χρονικά συνδεδεμένη

διαδικασία προκειμένου ο οστίτης ιστός να διατηρεί σταθερή τη μάζα του. Έτσι λοιπόν, γίνεται φανερό ότι όση οστική μάζα απορροφάται (bone resorption) τόση οστική μάζα θα πρέπει να δομείται (bone formation), δηλαδή η διαδικασία οστικού σχηματισμού και η διαδικασία οστικής απορρόφησης θα πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία (Drake 2010).

Όπως θα αναλυθεί παρακάτω, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην οστική ανακατασκευή διαδραματίζει η ισορροπία οστεοβλαστών-οστεοκλαστών, κύριος ρυθμιστής της οποίας φαίνεται να είναι το σύστημα των καλπαϊνών.

1.2.1 Δομή και φυσιολογία του οστίτη ιστού–Μακροσκοπική κατασκευή

Ο οστίτης ιστός ανάλογα με τη θέση των κυττάρων και της βασικής του οστικής ουσίας εμφανίζει δύο διαφορετικές μορφές:

- Συμπαγής ή φλοιώδης οστίτης ιστός (το 80% περίπου του σκελετού)
- Σπογγώδης ή δοκιδωτός οστίτης ιστός (το υπόλοιπο 20%)

Στο συμπαγή οστίτη ιστό, η βασική ουσία του οποίου είναι ιδιαίτερα πυκνή, οι οστικές δοκίδες έχουν τέτοια στενή επαφή μεταξύ τους, ώστε να σχηματίζουν ένα οστό παχύ, ομοιογενές και στέρεο. Στα συμπαγή οστά, κύτταρα και βασική ουσία έχουν μια συγκεκριμένη αρχιτεκτονική διάταξη που αποτελείται από τα συστήματα του HAVERS (οστεώνες). Το σύστημα του HAVERS είναι ένας επιμήκης πόρος συνήθως παράλληλος προς τον επιμήκη άξονα του μακρού οστού, ο οποίος περιέχει ένα αρτηρίδιο και ένα φλεβίδιο. Αποτελεί τον άξονα γύρω από τον οποίο είναι διατεταγμένα κυκλικά πεταλίδια οστίτη ιστού κατά τρόπο συμπαγή (χωρίς να αφήνουν κενά μεταξύ τους). Ο λεπιδωτός συμπαγής οστίτης ιστός είναι ο κανονικός ή ώριμος ιστός.

Ο σπογγώδης οστίτης ιστός είναι λιγότερο πυκνός και επομένως πιο ελαφρύς. Δεν έχει σωλήνες του HAVERS. Οι οστικές δοκίδες είναι τοποθετημένες κατά τέτοιο τρόπο, ώστε μεταξύ τους σχηματίζονται κοιλότητες, στο εσωτερικό των οποίων υπάρχει ο ερυθρός μυελός, ο οποίος σχηματίζει τα ερυθρά αιμοσφαίρια του αίματος. Οι οστικές του δοκίδες έχουν μια συγκεκριμένη διάταξη, είναι δηλαδή προσανατολισμένες έτσι, ώστε να αντέχουν το βάρος και τις μηχανικές πιέσεις και

είναι διατεταγμένες προς διάφορες κατευθύνσεις ανάλογα με τις μηχανικές ανάγκες κάθε οστού.

Ο ώριμος οστίτης ιστός αποτελείται από 206 οστά που διακρίνονται στα οστά του κρανίου, του κορμού και των άκρων. Άλλη κατηγοριοποίηση, που πραγματοποιείται ανάλογα με το μήκος τους είναι:

- Τα μακρά οστά (π.χ. βραχιόνιο, μηριαίο οστό), τα οποία έχουν δύο άκρα (επιφύσεις) και μεταξύ των άκρων αυτών, το σώμα του οστού, που ονομάζεται διάφυση και περικλείει το μυελό των οστών.
- Τα βραχέα οστά (π.χ. σπόνδυλοι, καρποί) που έχουν περίπου ίσες και τις τρεις διαστάσεις τους.

Μελετώντας την κατασκευή κάθε ώριμου οστού διακρίνουμε (από την εξωτερική προς την εσωτερική του επιφάνεια), τις εξής δομές:

- Το περίοστεο (ινοελαστικός υμένας που σχηματίζει το κάλυμμα των οστών. Βρίσκεται σε άμεση επαφή με όλες τις επιφάνειες εκτός από τις αρθρικές. Αποτελείται από μια πυκνή εξωτερική στοιβάδα που περιέχει πολυάριθμα αγγεία και μια εσωτερική στοιβάδα κυττάρων συνδετικού ιστού, τα οποία λειτουργούν ως οστεοβλάστες όταν τραυματιστεί το οστό, συμμετέχοντας έτσι στον νέο σχηματισμό οστού. Επίσης εξυπηρετεί ως υποστηρικτικός ιστός για τα αιμοφόρα αγγεία και βοηθά στην προστασία και τη θρέψη του οστού καθώς και στην πρόσφυση τενόντων και συνδέσμων.
- Την οστέινη ουσία (πρόκειται για τις διάφορες μορφές οστίτη ιστού όπως αναλύθηκαν παραπάνω).
- Το μυελό των οστών (αιμοποιητικό όργανο το οποίο κατά την εμβρυική ζωή παράγει ερυθροκύτταρα ενώ στην εξωμήτριο ζωή παράγει ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια και κοκκώδη λευκοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα).
- Τα αγγεία (ελέγχουν την αιμάτωση των οστών από α) την τροφοφόρο αρτηρία του κάθε οστού που διακλαδίζεται συνήθως σε ανερχόμενο και κατερχόμενο κλάδο τροφοδοτώντας με αίμα κυρίως τον μυελό των οστών και β) από τα αγγεία που ξεκινούν από το περίοστεο και τροφοδοτούν κυρίως τις εξωτερικές

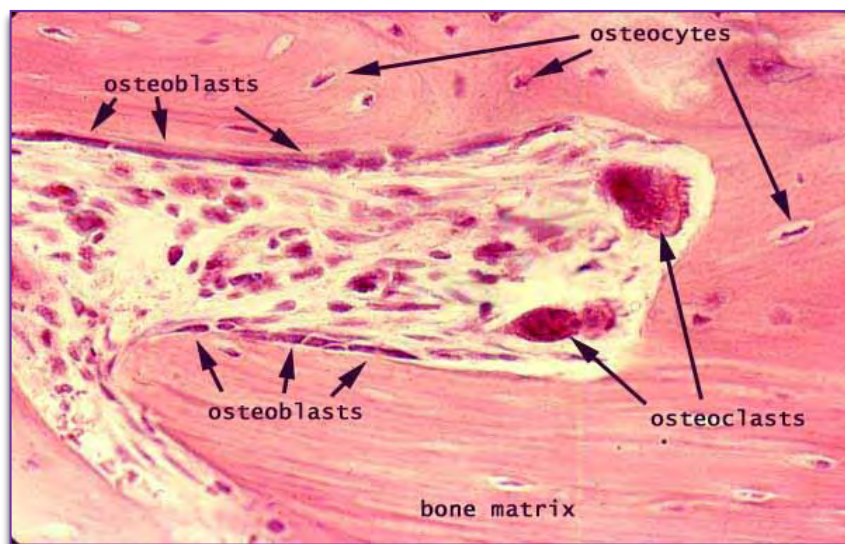
στιβάδες των οστών. Οι φλέβες των οστών δεν ακολουθούν συνήθως την πορεία των αρτηριών. Η αιματική κυκλοφορία των οστών ελέγχεται από τρεις μηχανισμούς: νευρικό, ορμονικό και μεταβολικό.

- Τα νεύρα, που βρίσκονται στο περίοστεο και συνοδεύουν την τροφοφόρο αρτηρία στο εσωτερικό του οστού. Είναι κυρίως νεύρα του συμπαθητικού και αποτελούν ρυθμιστές της αισθητικότητας. (Drake 2010, Stevens A. and Lowe J.S., 2004).

1.2.2 Δομή και φυσιολογία οστίτη ιστού - μικροσκοπική κατασκευή

Το ώριμο οστό είναι μία αρκετά σύνθετη μονάδα, η οποία αποτελείται από κυτταρικά συστατικά και από μεσοκυττάρια ουσία. Με τον όρο κυτταρικά συστατικά εννοούνται οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και οι οστεοκλάστες, με κύρια λειτουργία τους τη ρύθμιση του μεταβολισμού των οστών (Εικόνα 5).

Στα μη κυτταρικά συστατικά κατατάσσονται τα συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας, που διαχωρίζονται περεταίρω σε τρεις φάσεις (οργανική, ανόργανη και υδατική φάση) και ο ρόλος τους είναι η διατήρηση της δομής του οστού.



Εικόνα 5: Ηλεκτρονιογραφία μακρού οστού. Διακρίνεται ο μυελός των οστών, και τα κυτταρικά συστατικά του οστού (Slomianka L., 2009).

☑ Ο ρόλος των μη κυτταρικών συστατικών

Τα μη κυτταρικά συστατικά είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία και διατήρηση της μεσοκυττάριας ουσίας των οστών και διαχωρίζονται σε τρεις φάσεις (Weiner S. & Wagner H.D., 1998).

☛ *Την οργανική φάση*

Αποτελεί το 35% της κατά βάρος περιεκτικότητας του οστού. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στις βιοχημικές καθώς και στις μηχανικές λειτουργίες του οστού. Περιέχει κυρίως κολλαγόνο, από το οποίο το 98% αποτελείται από κολλαγόνο τύπου-I και το 2% από μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες, κύτταρα και μυελό.

- Το μόριο του κολλαγόνου των οστών είναι τύπου I και αποτελείται κυρίως από δύο ειδικά αμινοξέα, την υδροξυλυσίνη και την υδροξυπρολίνη. Συντίθεται στο εσωτερικό του οστεοβλάστη σαν τροποκολλαγόνο και στην συνέχεια οδηγείται και αποθηκεύεται στα σωμάτια Golgi. Η δομή του μορίου τροποκολλαγόνου αποτελείται από τρεις αλυσίδες, δύο άλφα-1 και μια άλφα-2. Πολλά μόρια προκολλαγόνου δημιουργούν κολλαγονικά ινίδια. Πολλά κολλαγονικά ινίδια δημιουργούν τις ίνες του κολλαγόνου. Οι ίνες στη συνέχεια διαπλέκονται με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργούν ένα στερεό υπόβαθρο, επάνω στο οποίο θα επικαθήσουν τα άλατα του ασβεστίου (υδροξυαπατίτης).
- Οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες είναι κυρίως πρωτεογλυκάνες, όπως οι γλυκοζαμινογλυκάνες, η οστεοποντίνη, η φιμπρονεκτίνη, η οστεοκαλσίνη, η οστεονεκτίνη κα άλλες. Πρόκειται για πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύουν μεγάλες ποσότητες ασβεστίου.

Η σημαντικότερη είναι η οστεοκαλσίνη που εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες. Πρόκειται για μια μικρού μεγέθους πρωτεΐνη (5,8kDa). Διαθέτει τρία κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος τα οποία καρβοξυλιώνονται, ως αποτέλεσμα μιας διαδικασίας μετάφρασης εξαρτώμενης από τη βιταμίνη K. Η συγκεκριμένη καρβοξυλίωση προσδίδει στην οστεοκαλσίνη την ικανότητα πρόσδεσης σ' αυτή ασβεστίου, ανάγοντάς την έτσι σε ένα σημαντικό παράγοντα της ασβεστοποίησης του

κολλαγόνου. Πιστεύεται ότι λειτουργεί ως αναστολέας του σχηματισμού νέου οστού ενώ έχει βρεθεί ότι επηρεάζει διάφορα ποιοτικά χαρακτηριστικά του βιοαπατίτη όπως είναι το μέγεθος των κρυσταλλιτών του και η ποσότητα των ανθρακικών ιόντων του. Συμμετέχει ενεργά στην οστεοποίηση και στην ομοιοστασία του ασβεστίου, αλλά έχει και ορμονικές δυνατότητες (π.χ. διεγείρει τα βήτα κύτταρα του παγκρέατος για την έκκριση ινσουλίνης). Η οστεοκαλσίνη ακόμη χρησιμοποιείται σαν δείκτης οστεοπαραγωγής (αύξησή της στο αίμα, δείχνει ότι κάποιο φάρμακο, όπως π.χ. η τεριπαρατίδη έχει οστεοπαραγωγικές δυνατότητες).

Η οστεονεκτίνη είναι μια όξινη γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες και συμμετέχει ενεργά στην ασβεστοποίηση των οστών. Θεωρείται ακόμη ότι βοηθά και στην εγκατάσταση των καρκινικών κυττάρων στα οστά και την τοπική ανάπτυξή τους σε ώριμο νεόπλασμα.

Στις μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες συμπεριλαμβάνονται και κάποιοι αυξητικοί παράγοντες, καθώς και κυτταροκίνες (Vaz M., et al, 2011).

☛ Την ανόργανη φάση

Αποτελεί το 60-65% της κατά βάρος περιεκτικότητας του οστού. Αποτελείται κυρίως (90%) από βιοαπατίτη, ένα σταθερότερο χημικό και δομικό ανάλογο του υδροξυαπατίτη ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), που την κάνει πλούσια σε φώσφορο και ασβέστιο (τα οστά περιέχουν το 99% του ασβεστίου και το 80% του φωσφόρου του οργανισμού). Το υπόλοιπο 10% αποτελείται από άλλα ιχνοστοιχεία όπως μαγνήσιο, νάτριο, κάλιο κ.ά. Οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη έχουν σχήμα βελόνων ή ραβδίων και είναι τοποθετημένοι παράλληλα με τα ινίδια του κολλαγόνου. Αφού ο οστεοβλάστης δημιουργήσει το κολλαγονικό υπόστρωμα αποστέλλει με εξωκύτωση στο περιβάλλον του (όπου υπάρχουν άφθονα ιόντα ασβεστίου και φωσφόρου), τμήματα-σμήματα της λιποειδικής του μεμβράνης τα οποία περιέχουν αλκαλική φωσφατάση. Τα σωματίδια αυτά αποτελούν τους πυρήνες για τη δημιουργία των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη. Αυτοί οι θετικά φορτισμένοι κρύσταλλοι έλκονται από τις γλυκοζοαμινογλυκάνες (μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες αλλά ισχυρά ανιονικές ουσίες, που ευρίσκονται ανάμεσα στα ινίδια του κολλαγόνου και χρησιμοποιούνται

για τη συγκόλλησή τους). Τελικά οι κρύσταλλοι θα καθηλωθούν επάνω στο κολλαγονικό υπόστρωμα και έτσι ασβεστοποιούνται τα οστά (Vaz M., et al, 2011).

Η ασβεστοποίηση των οστών γίνεται από τους οστεοβλάστες και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες τόσο τοπικούς όπως είναι η οστεοκαλσίνη και άλλες κυτταροκίνες αλλά και γενικούς όπως είναι η βιταμίνηD η οποία φαίνεται ότι είναι τουλάχιστον υπεύθυνη για τη δημιουργία υπερκορεσμένου περιβάλλοντος σε ασβέστιο και φώσφορο στην περιοχή της οστικής ανοικοδόμησης (Stevens A. and Lowe J.S., 2004).

Ο υδροξυαπατίτης όμως δεν χρησιμεύει μόνο για τη σκλήρυνση και τη σταθερότητα των οστών αλλά αποτελεί και τη μοναδική αποθήκη ασβεστίου στον οργανισμό. Έτσι σε περιπτώσεις που το ασβέστιο του αίματος είναι μειωμένο και η πρόσληψή του από το έντερο δεν είναι δυνατόν να αυξηθεί τότε εκκρίνεται από τους παραθυρεοειδείς αδένες η παραθορμόνη, η οποία δρώντας διαμέσου των οστεοβλαστών στους οστεοκλάστες, τους διεγείρει αυξάνοντας την οστεόλυση. Μοναδικός σκοπός της οστεόλυσης σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η παροχή ασβεστίου στον οργανισμό που επιτυγχάνεται με τη διάλυση των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη. Το μη ασβεστοποιημένο οστόν ονομάζεται οστεοειδές (Scinner 1987).

☛ *Την υδατική φάση*

Αναφέρεται στο συνολικό ποσοστό νερού στο οστό (5%). Απαντάται στη στοιβάδα που βρίσκεται στην επιφάνεια των κρυσταλλινών του βιοαπατίτη, στη δομή της τριπλής έλικας του μορίου του κολλαγόνου, μεταξύ των οστεοκυττάρων, των αποφυάδων τους και της θεμελίας ουσίας των οστών. Επίσης, νερό βρίσκεται και ανάμεσα στα άλλα συστατικά της οργανικής φάσης, όπως στο μυελό των οστών και ανάμεσα στους πόρους των ασβεστοποιημένων ινών κολλαγόνου. Τέλος, το νερό του μυελού πιστεύεται ότι παίζει ένα ακόμα σημαντικό ρόλο καθώς λειτουργεί ως μέσο για τη διέλευση όλων των απαραίτητων ιόντων για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οστού (Vaz M., et al, 2011).

☑ Ο ρόλος των κυτταρικών συστατικών

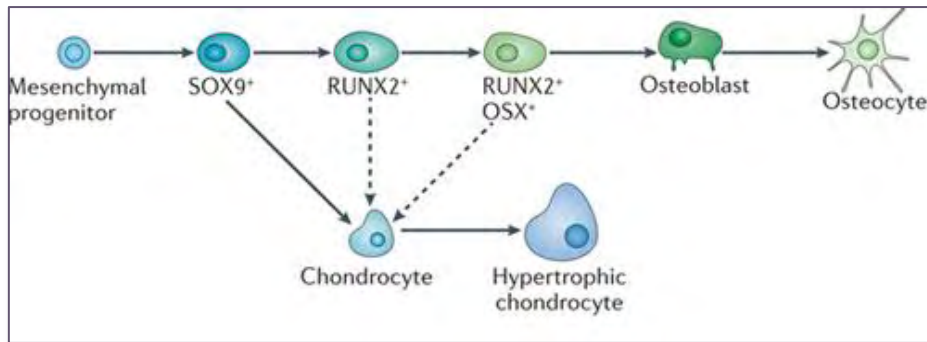
Οστεοβλάστες

Οι οστεοβλάστες είναι τα κύρια οστεοπαραγωγικά κύτταρα του οργανισμού. Προέρχονται από τα αρχέγονα μεσεγγυματικά κύτταρα που εδράζονται στο μυελό των οστών όπου και βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες.

Αρκετοί από τους παράγοντες που επάγουν την αιμοποίηση (κυτταροκίνες και άλλοι αυξητικοί παράγοντες) δρουν και στη διαφοροποίηση προς τις τελικές και ώριμες μορφές των οστεοκλαστών (τα πρώιμα στάδια της αιμοποίησης και της οστεοκλαστογένεσης διέρχονται μέσα από κοινά μονοπάτια). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα μόρια: IL-3, IL-6, IL-11, TNF, M-CSF, Leukemia Inhibitory Factor και Stem-cell Factor. Ιδιαίτερα η IL-6 κρίνεται απαραίτητη καθώς παράγεται και εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες ως απάντηση σε διάφορα μηνύματα, όπως μηνύματα ορμονών (παραθορμόνη, PTH-RP και 1,25-διυδροξυβιταμίνη D3), αυξητικών παραγόντων (TGF-β) και κυτταροκινών (IL-1 και TNF). Για να διαφοροποιηθούν σε ώριμους οστεοβλάστες πρέπει στα προγονικά κύτταρά τους να δράσουν ρυθμιστικοί παράγοντες όπως ο μεταγραφικός παράγοντας Cbfa1/Runx2 και ο *'osterix'* (OSX). Είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του οστού (κολλαγόνο, γλυκοζαμινάσες), την εναπόθεση των ανόργανων συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας, την ασβεστοποίησή της, καθώς και για τη διατήρηση όλων των παραπάνω (Raisz L.G., 2005), (Εικόνα 6).

Για να επιτύχουν όλα τα παραπάνω οι οστεοβλάστες εκκρίνουν σε μεγάλες ποσότητες κυτταροκίνες αλλά και άλλες πρωτεΐνες με παρακρινή ή αυτοκρινή δράση. Οι πιο γνωστές κυτταροκίνες είναι οι αυξητικοί παράγοντες TGF-β2 και IGF-1 όπως και οι μορφογενετικές πρωτεΐνες, ενώ από τις άλλες πρωτεΐνες οι περισσότερο μελετημένες είναι η οστεοποντίνη, η οστεονεκτίνη και φυσικά η οστεοκαλσίνη.

Οι οστεοβλάστες, όταν εγκλωβιστούν στο οστεοειδές που συνθέτουν μεταβάλλονται σε κύτταρα με σφηνοειδές σχήμα και άφθονες νηματοειδείς αποφυάδες, τα οστεοκύτταρα (Kini U. & Nandeesh, B.N., 2012).



Εικόνα 6: Πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα εγείρουν την ανάπτυξη οστεοβλαστών και χονδροκυττάρων, υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα SOX9. Ο SOX9 επάγει την έκφραση του RUNX2 και του OSX, τα οποία μεταφέρουν σήμα για την ανάπτυξη χονδροκυττάρων ή οστεοβλαστών, μέρος των οποίων εγκλωβίζεται στο οστεοειδές και μετατρέπεται σε οστεοκύτταρα (Long F., 2012).

Οστεοκύτταρα

Τα οστεοκύτταρα είναι απόγονοι των οστεοβλαστών. Πρόκειται για οστεοβλάστες οι οποίοι μετά τη διαδικασία σχηματισμού του οστού παρέμειναν σε κοιλότητες του νεοσχηματισθέντος οστού εξαιτίας της ίδιας της λειτουργία τους, της έκκρισης δηλαδή οργανικής μήτρας.

Είναι κύτταρα με έναν πυρήνα. Η ζωή τους διαρκεί όσο και του ατόμου (δεν πολλαπλασιάζονται). Ο κύριος ρόλος των οστεοκυττάρων είναι να συντελούν στη μεταφορά υλικών από το υγρό περιβάλλον του ιστού στο οστό και αντιστρόφως. Σύμφωνα με νεότερες απόψεις, είναι αυτά που είτε διαμέσου του εξωκυττάριου υγρού των οστών με το οποίο ευρίσκονται σε άμεση επικοινωνία είτε διαμέσου των αποφυάδων τους (ηλεκτρικά ερεθίσματα) λειτουργούν ως μηχανοϋποδοχείς. Επίσης απαντούν σε ουσίες που κυκλοφορούν στο εξωκυττάριο υγρό (ορμόνες, κυταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες κ.α.), πυροδοτώντας την κατάλληλη αντίδραση. Οι δύο αυτοί μηχανισμοί επιτρέπουν στα οστεοκύτταρα να ελέγχουν την ανάπτυξη των οστών αλλά και τη διατήρησή τους σε καλή κατάσταση (Long F., 2012).

Τα οστεοκύτταρα μπορούν επίσης να προκαλέσουν οστεόλυση όπως οι οστεοκλάστες, ίσως για να δημιουργήσουν τους μικροδιαύλους (canaliculi) και τον οστικό λάκκο (lacuna), μέσα στον οποίο ζουν. Αν και έχουν μικρή παραγωγική δραστηριότητα εκκρίνουν μια σημαντική πρωτεΐνη τη σκληροστίνη (sclerostin). Η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται με τους υποδοχείς LRP5/LRP6, αναστέλλει το μονοπάτι

Wnt, με αποτέλεσμα την αναστολή της οστεοπαραγωγής. Την σκληροστίνη την αναστέλλει η παραθορμόνη και η εφαρμογή μηχανικής πίεσης στα οστά (F. Long, 2012). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι ο ρόλος των οστεοκυττάρων στην οστική αναδόμηση είναι ιδιαίτερα σημαντικός και από αυτά τα κύτταρα εξαρτάται ίσως η καθημερινή επιδιόρθωση των οστών από τις διάφορες βλάβες (Ducy P., et al, 2000).

Οστεοκλάστες

Η τρίτη κατηγορία κυτταρικών συστατικών του οστίτη ιστού είναι οι οστεοκλάστες. Πρόκειται για κύτταρα που δημιουργούνται μετά από σύμπτυξη μονοπύρηνων του αίματος, ως αντίδραση σε ενδογενή ή εξωγενή ερεθίσματα. Τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά είναι παρόμοια με αυτά των φαγοκυττάρων (πολυπύρρηνα κύτταρα, έντονα κινητικά που περιβάλλονται από μία μεμβράνη, την πτυχωτή ή κροσσωτή μεμβράνη). Έχουν μεγάλο μέγεθος (όγκος πάνω από $2 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) ενώ διαθέτουν πάνω από 100 πυρήνες. Οι οστεοκλάστες εμφανίζονται νωρίς στο έμβρυο μαζί με τους πρώτους πυρήνες οστέωσης και χρησιμεύουν για την αποδόμηση και απορρόφηση της οστέινης ουσίας και του αποτιτανωμένου χόνδρου (χονδροκλάστες) κατά τη διάρκεια της διαρκούς αναδόμησης και ανακατασκευής των οστών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των βοθρίων του Howship (βαθείς σκαφοειδείς κοιλότητες στην οστέινη ουσία) (Boyle W.J., et al, 2003).

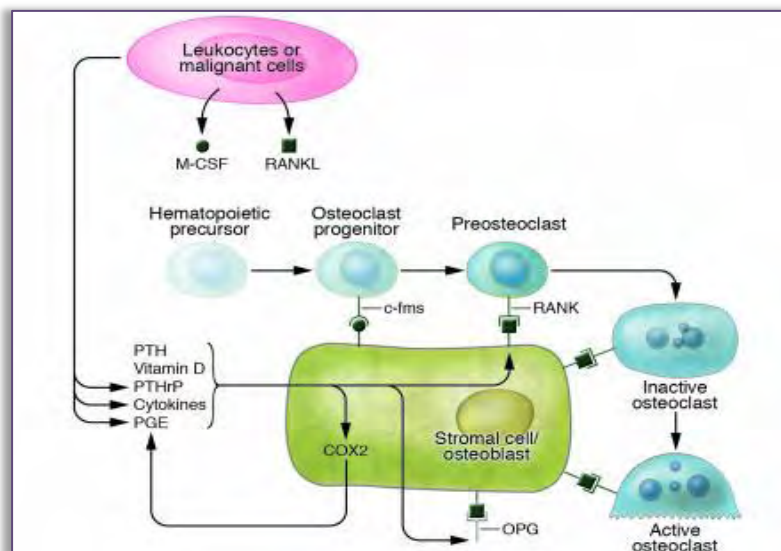
Οι ρόλοι των οστεοκλαστών είναι:

- i. Η λύση της θεμέλιας ή μεσοκυττάριας ουσίας των οστών και η απόδοση ασβεστίου στον οργανισμό.
- ii. Η συμμετοχή στην διατήρηση του οστού και στην επιδιόρθωση των δομικών ατελειών και μικροβλαβών του.
- iii. Η απορρόφηση (αποικοδόμηση) του ήδη σχηματισμένου οστού (αυτό επιτυγχάνεται με την έκκριση ινωδών πρωτεϊνών).

Η παραγωγή και η λειτουργικότητα των οστεοβλαστών ρυθμίζεται από τους οστεοβλάστες και τα επενδυτικά κύτταρα του οστού μέσω του συστήματος RANKL (Receptor-Activator of Nuclear factor KappaB-Ligand), καθώς και με την επίδραση του M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor).

Ο RANKL είναι μια κυτταροκίνη που ανήκει στην υπερ-οικογένεια του TNF (Tumor Necrosis Factor). Οι ουσίες αυτές αρχικά συγκεντρώνουν τα μακροφάγα με χημειοταξία, στην περιοχή που πρόκειται να αρχίσει η οστεόλυση, στη συνέχεια τα τροποποιούν έτσι ώστε να μπορούν να συντηχθούν και να δημιουργήσουν πολυπύρρηνα κύτταρα και τελικά βοηθούν στην ωρίμανσή τους σε δραστικούς οστεοκλάστες (Raisz L. G., 2005). Πιο συγκεκριμένα:

- Ο M-CSF συνδέεται στην επιφάνεια του μονοκύτταρου-μακροφάγου με το υποδοχέα του (c-fms) ενεργοποιώντας μια σειρά ενδογενών αντιδράσεων (tyrosine kinase Src) η οποία το τροποποιεί και το προετοιμάζει για την επίδραση του RANKL.
- Ο RANKL συνδεόμενος με το RANK στην επιφάνεια του κυττάρου διεγείρει την ενεργοποίηση του NF-κβ και συνεχίζει την διαφοροποίηση του οστεοκλάστη, την συνένωσή του με άλλα μακροφάγα και την ενεργοποίησή του σε οστεολυτικό κύτταρο (Εικόνα 7).



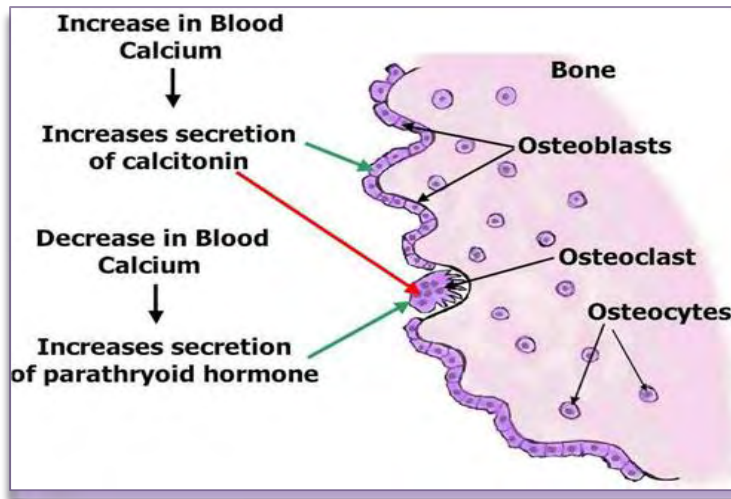
Εικόνα 7: Η ενεργοποίηση των οστεοκλαστών από τους οστεοβλάστες μέσω του συστήματος RANK-RANKL/OPG. Οι οστεοβλάστες διεγείρονται από εξωκυτάρια σήματα (π.χ. ορμόνες), παράγουν τον προσδέτη του RANK (RANKL), και ο υποδοχέας M-CSF συνδεμένος στη μεμβράνη των οστεοβλαστών ενώνεται με τον προσδέτη του (c-fms), επάγοντας τη διαφοροποίηση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων σε πρόδρομους οστεοκλάστες, οι οποίοι στη συνέχεια εκφράζουν τον RANK. Η αλληλεπίδραση RANK/RANKL επάγει την ωρίμανση των πρόδρομων οστεοκλαστών σε ώριμους και λειτουργικούς οστεοκλάστες. Η δράση του συστήματος RANK/RANKL αναστέλλεται από το διαλυτό OPG. Παράγοντες που επάγουν την οστική επαναρρόφηση είναι ικανοί να διεγείρουν τη δραστηριότητα του COX2, η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει τα RANKL και OPG (Raisz L. G., 2005).

1.2.3 Ισορροπία οστεοβλαστών/οστεοκλαστών και οστική ανακατασκευή

Η ισορροπία μεταξύ οστεοβλαστών και οστεοκλαστών έχει καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας και της ομοιόστασης του οστίτη ιστού, μέσω της πολύπλοκης διαδικασίας της οστικής ανακατασκευής.

Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν, με γνωστό ή αδιευκρίνιστο μέχρι στιγμής ρόλο, την αλληλεπίδραση οστεοβλαστών/οστεοκλαστών. Οι παράγοντες αυτοί δρουν είτε για να ενεργοποιήσουν είτε για να αναστείλουν τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών, οπότε επάγουν ή αναστέλλουν, αντίστοιχα, την οστική απορρόφηση. Πρόκειται για μηνύματα τα οποία δεν προέρχονται μόνο από τους οστεοβλάστες, αλλά και από μονοκύτταρα, T και B λεμφοκύτταρα και των οποίων η δράση επηρεάζεται από την παρουσία ή όχι οιστρογόνων (Raisz L.G.,2005).

Ο όρος οστική ανακατασκευή περιγράφει τη διαδικασία ανανέωσης των οστών, με σκοπό την επιδιόρθωση μικροφθορών στο ώριμο οστό αλλά και τη διατήρηση της ομοιοστασίας του ασβεστίου στον εξωκυττάριο χώρο. Η διαδικασία της οστικής ανακατασκευής αρχίζει με την οστική απορρόφηση διά μέσου των οστεοκλαστών και συνεχίζεται με την απόθεση, στα σημεία απορρόφησης νέου οστού, που παράγεται από τους οστεοβλάστες. Η απορρόφηση από τους οστεοκλάστες δεν προχωρεί σε βάθος εάν δεν ολοκληρωθεί πρώτα η πλήρωση (τοποθέτηση νέου οστού) από τους οστεοβλάστες (Sevitt, 1981). Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από ορμονικούς παράγοντες στον οργανισμό, κυρίως από την παραθορμόνη (Εικόνα 8). Αποτελεί μια ισόβια δυναμική ισορροπία του σκελετικού συστήματος μεταξύ του σχηματισμού νέου οστού από τους οστεοβλάστες και της αποδόμησης του παλαιού από τους οστεοκλάστες που συντελείται μόνο στην επιφάνεια του οστού, όπου η διαδικασία της οστεόλυσης διαρκεί τυπικά 7-10 ημέρες, ενώ ο οστικός σχηματισμός απαιτεί 2-3 μήνες. Αυτή ρυθμίζεται από μια σειρά τοπικών και συστημικών παραγόντων, όπως οι ορμόνες (π.χ. θυρεοειδικές, παραθορμόνη, καλσιτονίνη, βιταμίνη D, οιστρογόνα, ανδρογόνα, κορτιζόλη, αυξητική ορμόνη) και αυξητικοί παράγοντες, π.χ. IGF-1, TGF-β, VEGF και κυτταροκίνες.



Εικόνα8: Διατήρηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου και ορμονικός έλεγχος της ισορροπίας της δράσης οστεοβλαστών/οστεοκλαστών από την παραθυροειδή ορμόνη (New York Center for Advanced Parathyroid Surgery, 2012).

Η οστική αναδόμηση δεν αφορά όλο το σκελετό. Κάθε φορά επιλέγονται μικρά τμήματα του, που ονομάζονται Βασικές Πολυκυτταρικές Μονάδες (ΒΠΜ). Σύμφωνα με το κλασικό μονοπάτι (serial pathway) η επιλογή γίνεται από τα οστεοκύτταρα αφού διεγερθούν, είτε από τα τοπικά εφαρμοζόμενα κάθε στιγμή μηχανικά ερεθίσματα ή από τοπικές κυτταροκίνες. Πιστεύεται ότι κάθε 10 δευτερόλεπτα ενεργοποιείται μία ΒΠΜ (Taylor & Francis Boyce, et al, 2008).

Η οστική αναδόμηση πραγματοποιείται σε πέντε φάσεις. Ενώ η σειρά των φάσεων δεν αλλάζει, η ταχύτητα αλληλοδιαδοχής, η χρονική διάρκεια και η ένταση κάθε μίας αλλάζει και προσδιορίζει το ρυθμό οστικής αναδόμησης (bone turnover). Σε φυσιολογικές καταστάσεις ο χρόνος για να συμπληρωθεί ο κύκλος μιας οστικής αναδόμησης κυμαίνεται από 3 έως 6 μήνες. Οι φάσεις ενός κύκλου οστικής αναδόμησης απεικονίζονται στην Εικόνα 9 (Kini U., & Nandeesh B.N., 2012) και είναι οι ακόλουθες:

- ✓ Φάση ηρεμίας
- ✓ Φάση ενεργοποίησης

Κατά τη φάση ενεργοποίησης παρατηρείται μετάπτωση των προ-οστεοκλαστών σε οστεοκλάστες. Το εκκλυτικό αίτιο, όποιο και αν είναι, επιδρά στα επενδυτικά κύτταρα

της ΒΠΜ, που είναι παραλλαγμένοι οστεοβλάστες, τα οποία ενεργοποιούνται και εκκρίνουν στο μικροπεριβάλλον τους διάφορες ουσίες όπως: τον παράγοντα διέγερσης αποικιών μονοκυττάρων (M-CSF), την ιντερλευκίνη 11 (IL-11), την ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και τον RANKL. Όλες αυτές οι ουσίες σκοπό έχουν την προσέλκυση των μονοκυττάρων μακροφάγων στην περιοχή, τον πολλαπλασιασμό τους και τη σύντηξή τους σε ένα μεγάλο πολυπύρρνο κύτταρο που αποτελεί τον ώριμο οστεοκλάστη. Αυτός στη συνέχεια θα προσκολληθεί με την πτυχωτή του μεμβράνη στη θεμέλιο ουσία και θα αρχίσει την οστεόλυση.

✓ Φάση αποικοδόμησης ή οστεόλυσης

Κατά τη φάση αυτή οι ενεργοποιημένοι οστεοκλάστες απορροφούν την κατεστραμμένη θεμέλια ουσία. Επιπλέον ελεύθερες ρίζες O_2 διαλύουν το κολλαγόνο (Key L.L., et al, 1990). Βασική και απαραίτητη προϋπόθεση για να δράσει ο οστεοκλάστης είναι η πλήρης επαφή της πτυχωτής του μεμβράνης με τη θεμέλιο ουσία και η δημιουργία σφραγισμένης ζώνης (sealing zone). Για να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιεί ειδικές προσκολλητικές πρωτεΐνες, τις ιντεγκρίνες, οι οποίες δεσμεύονται με αντίστοιχες πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας, όπως είναι η οστεοποντίνη, σε μία περιοχή του μορίου τους με καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων (Αργινίνη-Γλυκίνη-Ασπαρτάμη) (Boyce B. F., & Xing L., 2008).

✓ Φάση αναστροφής

Κατά την διάρκεια της φάσης αναστροφής οι οστεοκλάστες εξαφανίζονται από το βοθρίο απορρόφησης, όπου εμφανίζονται οι οστεοβλάστες. Η αναστροφή αυτή πιστεύεται ότι συμβαίνει για δύο κύριους λόγους:

- i. Ο ένας αφορά τον οστεοκλάστη ο οποίος φέρει στην επιφάνειά του έναν υποδοχέα ασβεστίου. Ο υποδοχέας αυτός διευκολύνει την είσοδο ασβεστίου στο κύτταρο. Όταν το ποσόν του ασβεστίου φθάσει σε κάποιο επίπεδο και κορεσθεί ο οστεοκλάστης, αναστέλλεται η οστεόλυση και ο οστεοκλάστης αποχωρεί από την περιοχή.

- ii. Ο δεύτερος λόγος αφορά μία κυτταροκίνη. Έχει βρεθεί ότι ανάμεσα στις πρωτεΐνες του κολλαγονικού δικτύου και στερεά συνδεδεμένη με αυτές, βρίσκεται μία κυτταροκίνη, ο παράγοντας TGF- β -2. Κατά τη διάρκεια της οστεόλυσης, ο β -2 αποδεσμεύεται και ελεύθερος πλέον δρα σε 4 επίπεδα:

- α) αναστέλλει τη δημιουργία νέων οστεοκλαστών,
- β) προσκαλεί οστεοβλάστες στην περιοχή της οστεόλυσης,
- γ) αυξάνει τον πολλαπλασιασμό τους και
- δ) τους διεγείρει για να δημιουργήσουν νέο οστόν.

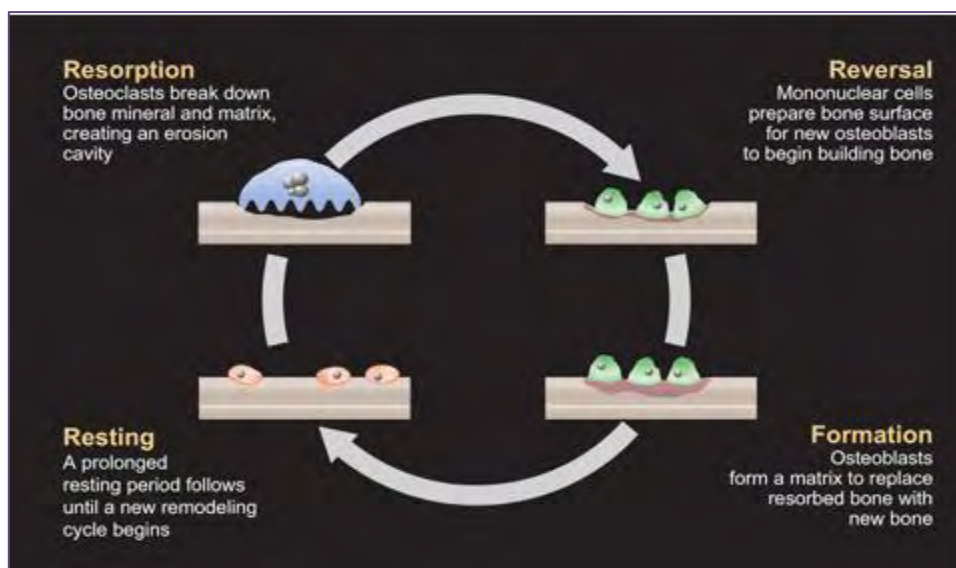
Η φάση της αναστροφής διαρκεί 1-2 εβδομάδες (Boyce B. F., & Xing L., 2008).

✓ Φάση ανοικοδόμησης ή οστεοπαραγωγής

Το τελικό στάδιο, κατά το οποίο οι οστεοβλάστες που βρίσκονται τοποθετημένοι σε ένα βοθρίο που δημιουργήθηκε λίγο πριν από τους οστεοκλάστες, αρχίζουν να τοποθετούν νέο οστό. Η φάση της οστεοπαραγωγής εξελίσσεται σε 2 στάδια.

- i. Στο πρώτο παράγεται το δίκτυο των κολλαγονικών ινιδίων και δημιουργείται το οστεοειδές (η οργανική ουσία), με δομή σπογγώδη ή συμπαγή, ανάλογα με τις μηχανικές απαιτήσεις της περιοχής.
- ii. Στο δεύτερο, επάνω στο ήδη υπάρχον κολλαγονικό δίκτυο δημιουργούνται και εναποτίθενται οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη (επιμετάλλωση).

Έτσι επέρχεται η βαθμιαία ασβεστοποίηση της οστικής μάζας με τη βοήθεια μη κολλαγονικών πρωτεϊνών όπως είναι η οστεοκαλσίνη και πολλές άλλες. Τα δύο στάδια διαφέρουν μεταξύ τους χρονικά κατά 2 έως 10 ημέρες. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής δρουν και βοηθούν τη δημιουργία της οστικής μάζας διάφορες κυτταροκίνες όπως κυρίως ο Insulin Growth Factor (IGF-1,2-ιδιαίτερα ο 1) και οι μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs), (Kini U., & Nandeesh B. N., 2012).



Εικόνα 9: Τα στάδια της φυσιολογικής οστικής ανακατασκευής (bone remodeling) του κλασσικού μονοπατιού με τη σχηματική απεικόνιση του ρόλου των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών στον οστικό σχηματισμό και στην οστεόλυση αντίστοιχα. Η οστική επιφάνεια από τη φάση ηρεμίας μεταπίπτει στη φάση της οστεόλυσης μετά από ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Ακολούθως, δημιουργείται η οστική κοιλότητα τη λείανση της οποίας πραγματοποιούν μονοπύρρηνα λεμφοκύτταρα. Ενεργοποίηση των οστεοβλαστών εντός της οστικής κοιλότητας οδηγεί στην έναρξη της οστεοσύνθεσης και επιμετάλλωση της αποδομηθείσας περιοχής. Με την ολοκλήρωση της τοπικής οστεοσύνθεσης επέρχεται η παύση της οστικής ανακατασκευής και αποκατάσταση της οστικής επιφάνειας (Roodman G.D., 2004).

Υπάρχει και μία δεύτερη θεωρία για τη συνδυασμένη δράση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, γνωστή ως παράλληλο μονοπάτι (Parallel Pathway). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες ενεργοποιούνται ταυτόχρονα μέσω αλληλεπίδρασης RANK και RANKL, μία θεωρία λιγότερο επικρατούσα εν σχέση με το κλασσικό μονοπάτι (Kini U. & Nandeesh B. N., 2012).

Κατά την εξέλιξη της διαδικασίας της οστεοπαραγωγής που θα διαρκέσει περίπου 3 μήνες, μερικοί από τους οστεοβλάστες (10-20%) θα παγιδευθούν μέσα στον οστίτη ιστό, με αποτέλεσμα το πρωτόπλασμά τους να αποκτήσει νηματοειδείς προεξοχές που θα έρθουν σε επαφή με τις νηματοειδείς προεξοχές άλλων οστεοβλαστών και θα μεταπέσουν βαθμιαία σε οστεοκύτταρα. Στο τέλος της φάσης της οστεοπαραγωγής οι επιφανειακοί οστεοβλάστες θα μετατραπούν σε επενδυτικά

κύτταρα, θα καλύψουν το νέο οστό και η ΒΠΜ θα μεταπέσει ξανά στη φάση ηρεμίας. Κάθε στιγμή, το μεγαλύτερο μέρος του οστίτη οστού βρίσκεται σε φάση ηρεμίας (Kini U. & Nandeesh B.N., 2012).

Στις νεαρές ηλικίες (έως την ηλικία των 20 ετών περίπου) η ισορροπία είναι μετατοπισμένη προς τους οστεοβλάστες, δηλαδή ο ρυθμός παραγωγής οστού είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό αποικοδόμησής του, με αποτέλεσμα την αύξηση της οστικής μάζας. Το αποτέλεσμα είναι η οστική μάζα να αυξάνεται προοδευτικά και να φτάνει τη μέγιστη τιμή της (κορυφαία οστική μάζα) γύρω στο 25^ο έτος της ηλικίας. Ακολουθεί μια μακρά περίοδος όπου η ανταγωνιστική δράση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών είναι ισόρροπη, ώστε το τελικό αποτέλεσμα να διατηρεί σταθερή τη συνολική οστική μάζα του σκελετού (Nordin B.E.C., 1971).

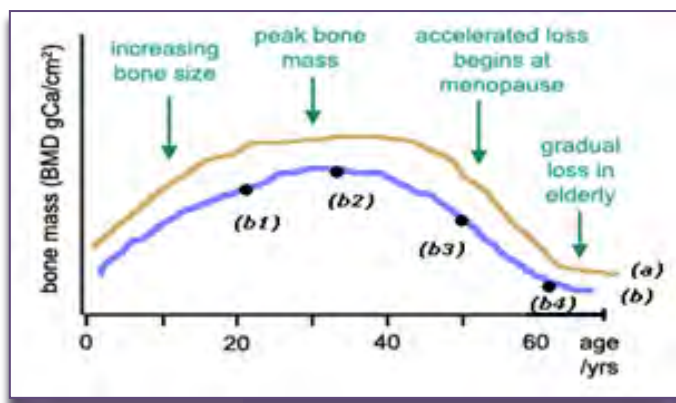
Σε μεγαλύτερες ηλικίες όμως παρατηρείται αυξημένη ένταση της ενεργότητας των οστεοκλαστών, με αποτέλεσμα να προκαλείται ένα ελαφρώς αρνητικό ισοζύγιο, που έχει ως συνέπεια μια σταδιακή μικρή μείωση της οστικής πυκνότητας σε σχέση με την ηλικία, με ρυθμό της τάξης του 0,3-0,5% το χρόνο και στα δύο φύλα (Nordin, 1971).

Πιο έντονα είναι τα συμπτώματα στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, λόγω της ταχείας μείωσης των οιστρογόνων, όπου ο ρυθμός αυτός αυξάνεται σημαντικά σε 1-3% απώλεια οστικής μάζας το χρόνο και μπορεί να φτάσει ακόμα και μέχρι τα 7-8% με το σκελετικό σύστημα να βρίσκεται σε αρνητικό ισοζύγιο ασβεστίου, με καθαρή οστική απώλεια, η οποία συνεχιζόμενη θα επιφέρει διαταραχές της μικροαρχιτεκτονικής του οστού, μειωμένη μηχανική αντοχή και αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων (Schapira D. & Schapira C., 1992), (Εικόνα 10).

☒ Οστική πυκνότητα

Ο όρος αντιπροσωπεύει την πυκνότητα του οστού, η οποία αποτελείται κυρίως από άλατα ασβεστίου, κολλαγόνο και διάφορα άλλα μέταλλα. Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή τόσο ισχυρότερα είναι τα οστά. Η ισόρροπη σύνδεση της οστικής αποδόμησης με την οστική σύνθεση μέσω κυτταρικών μηχανισμών ονομάζεται σύζευξη (coupling) και έχει σαν σκοπό την ομοιοστάση της οστικής πυκνότητας (Schapira D., & Schapira C., 1992).

Οστική απώλεια έχουμε όταν οι οστεοκλάστες δημιουργούν κοιλότητες μεγαλύτερες ή βαθύτερες από τις κανονικές ή όταν οι οστεοβλάστες αδυνατούν να γεμίσουν τις κανονικές ή όταν συμβαίνουν και τα δύο.



Εικόνα 10: α) Η οστική πυκνότητα σε συνάρτηση με την ηλικία. β) Χαμηλότερη οστική πυκνότητα σε συνάρτηση με την ηλικία και επιμέρους παράγοντες: (b1) Σε νεαρές ηλικίες, χαμηλή οστική μάζα μπορεί να παρατηρηθεί λόγω κάποιας γενετικής αιτιολογίας, κακής διατροφής, λάθος άσκησης, καταχρήσεων (καπνός, αλκοόλ), (b2) Στη μέση ηλικία, λόγω ιδιοπαθών αιτιών, χειρουργικών επεμβάσεων, υπογοναδισμού, (b3) φυσιολογική εμμηνόπαυση (b4) αυξημένη οστική απορρόφηση από παθολογικά αίτια (Sheth R.D., 2002).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους αυξάνεται η οστική απώλεια, είναι η αύξηση της συχνότητας ενεργοποίησης ή/και η αύξηση του στοιχειώδους οστικού ελλείμματος κατά το τέλος κάθε κύκλου ανακατασκευής. Με τον όρο συχνότητα ενεργοποίησης (activation frequency) εννοούμε το μέσο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ δύο διαδοχικών κύκλων οστικής ανακατασκευής στην ίδια θέση της οστικής επιφάνειας. Η συχνότητα ενεργοποίησης είναι ο καλύτερος ιστολογικός δείκτης του ρυθμού της οστικής ανακατασκευής σε μια επιφάνεια και ο κύριος παράγοντας που προσδιορίζει την οστική εναλλαγή (bone turnover). Ως οστική εναλλαγή ορίζεται ο όγκος του οστίτη ιστού που αποδομείται και αντικαθίσταται κατά την ανακατασκευή. Σε φυσιολογικές συνθήκες η διαταραχή της απορρόφησης γίνεται κατευθυνόμενα και ελεγχόμενα είτε επειδή υπάρχει έλλειψη στην πρόσληψη ασβεστίου είτε για λόγους μηχανικούς επιβάλλεται η απορρόφηση σε κάποιο σημείο. Η γρήγορη όμως αντιδραστική απορρόφηση, ακολουθείται αργότερα από βραδύτερη διαδικασία εναπόθεσης (Raisz, 2005).

1.2.4 Διαταραχή ισορροπίας οστεοβλαστών/οστεοκλαστών – Οστεοπόρωση

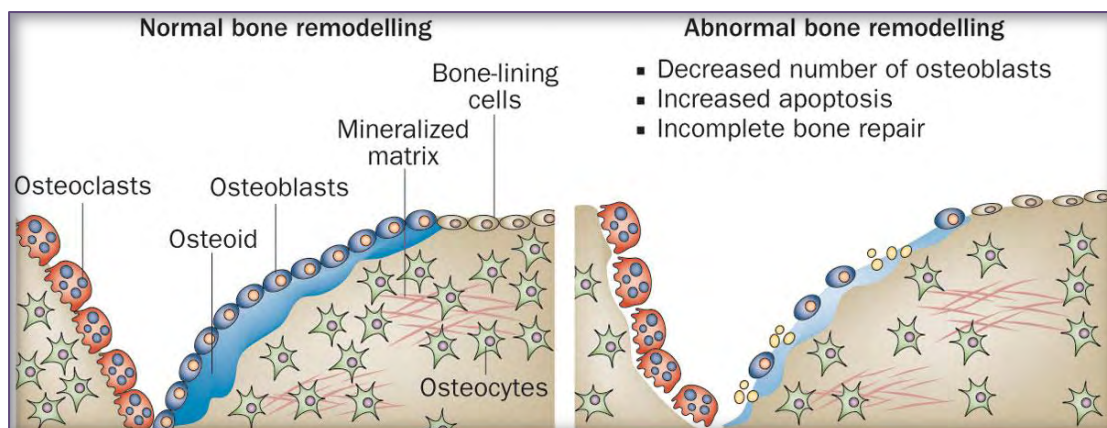
Οι διαταραχές στην ισορροπία οστεοβλαστών/οστεοκλαστών, όπως και στην οστική ανακατασκευή, έχουν συνδεθεί με μια σειρά παθήσεων. Η κυριότερη εξ' αυτών, από πλευράς συχνότητας, είναι η οστεοπόρωση. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχείαόπως αυτά καταγράφηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

Πίνακας 2: Στατιστικά στοιχεία για την οστεοπόρωση (World Health Organization, 2003)

Στατιστικά στοιχεία για την οστεοπόρωση παγκοσμίως		
Αριθμός ασθενών	>200 εκατομμύρια παγκοσμίως	
Ασθενείς	Γυναίκες>Άνδρες	Ηλικίες >50: 1 στις 3 γυναίκες, 1 στους 5 άνδρες
Ετήσια κατάγματα από οστεοπόρωση	8,9 εκατομμύρια	Συχνότητα εμφάνισης: 1 κάθε 3 sec
Εμφάνιση σε Ελληνίδες	< 50 ετών, 1 στις 3	

Η οστεοπόρωση είναι μία συστηματική, χρόνια πάθηση του μεταβολισμού των οστών, η οποία εκδηλώνεται ως αυξημένη ευθραυστότητα των οστών λόγω μειωμένης ποσότητας και αλλοίωση της ποιότητάς τους. Χαρακτηριστικό της είναι η χαμηλή οστική μάζα και η διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού, η οποία συνεπάγεται αυξημένη ευθραυστότητα του οστού και τάση για κατάγματα τα οποία αποτελούν την κύρια κλινική εκδήλωση της οστεοπόρωσης και εντοπίζονται κυρίως στο κάτω τριτημόριο της κερκίδας, στους σπονδύλους και στο άνω τριτημόριο του μηριαίου (άρθρωση ισχίου) (Consensus Development Conference, 1996).

Η εμφάνιση της νόσου συνδέεται με ταυτόχρονη αυξημένη οστεοκλαστική και μειωμένη οστεοβλαστική δραστηριότητα (Εικόνα 11). Εμφανίζεται όταν η συνδυαστική δράση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών είναι τέτοια ώστε να προκαλεί σημαντική μείωση στην οστική μάζα (Raisz, 2005).



Εικόνα11: Η διαδικασία οστικής ανακατασκευής σε υγιές οστό (αριστερά) και σε οστεοπορωτικό οστό (δεξιά). Φαίνεται η διαταραχή της ισορροπίας των οστεοβλαστών/οστεοκλαστών που οδηγεί σε αυξημένη καταστροφή του οστού από τους οστεοκλάστες, χωρίς να υπάρχει αντίστοιχη ποσότητα σχηματιζόμενου οστού από τους οστεοβλάστες (Mäkitie O., 2013).

Οι ορμόνες του φύλου ασκούν την αντιοστεοπορωτική τους δράση, τουλάχιστον εν μέρει, ρυθμίζοντας την ανάπτυξη των οστικών κυττάρων στο μυελό των οστών και ίσως το ρυθμό του κυτταρικού θανάτου τους. Ως εκ τούτου, η φάση της ταχείας οστικής απώλειας που παρατηρείται με την πτώση των ορμονών του φύλου διαφέρει από εκείνη της γήρανσης, όχι μόνο όσον αφορά στη χρονική στιγμή, αλλά και όσον αφορά στις κυτταρικές διαταραχές. Στους άνδρες η πρώτη φάση δεν εμφανίζει αξιοπρόσεκτα συμπτώματα καθώς υφίστανται μόνο βραδεία και προοδευτική μείωση της παραγωγής ανδρογόνων, σε αντίθεση με τη ξαφνική μείωση των οιστρογόνων, η οποία συμβαίνει κατά την εμμηνόπαυση στις γυναίκες. Η ανισορροπία μεταξύ οστικής απορρόφησης και οστικής παραγωγής η οποία προκαλείται από αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα, όπως συμβαίνει στην περίοδο αμέσως μετά την εμμηνόπαυση, είναι πιο καταστροφική από την άποψη της δομής του οστού, από ότι αυτή που οφείλεται σε μειωμένη οστεοβλαστική δραστηριότητα, όπως συμβαίνει κατά τη φάση της βραδείας οστικής απώλειας λόγω γήρατος (Riggs B.L., et al, 1982). Υπερβολική οστεοκλαστική δραστηριότητα μπορεί να οδηγήσει στη διάτρηση και στην απώλεια ολόκληρων δοκίδων στο δοκιδωτό οστό έτσι ώστε η επακόλουθη φάση της οστικής παραγωγής να εξαλείφεται. Οι οστεοβλάστες δεν έχουν έδαφος για να παράγουν νέο οστό. Αντίθετα, η μείωση της οστεοβλαστικής δραστηριότητας οδηγεί μόνο σε λείπτυνση των δοκίδων.

Επιπλέον, διάφοροι άλλοι παράγοντες, τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί συνεισφέρουν στη εμφάνιση οστεοπόρωσης (World Health Organization, 2003):

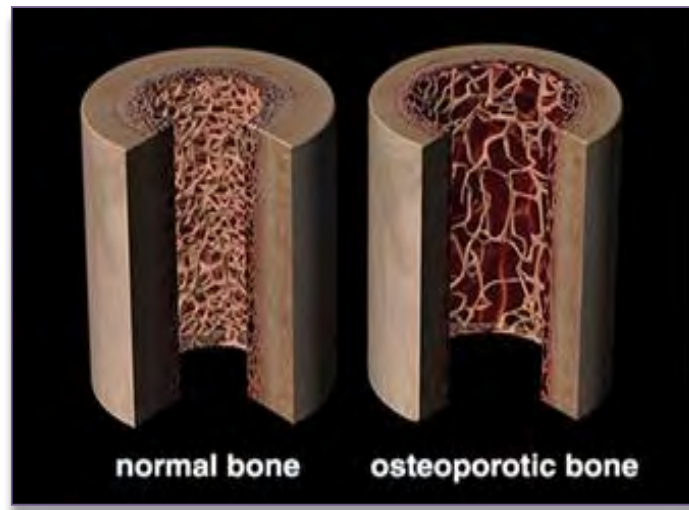
- Τροφές που εμποδίζουν την απορρόφηση του ασβεστίου (καφεΐνη, αναψυκτικά, αλκοόλ, τσάι, ζάχαρη, αλάτι, σόγια, οξαλοξικό οξύ κ.α.)
- Φάρμακα [στεροειδή, αντιεπιληπτικά, βαρβιτουρικά, αντιόξινα (που περιέχουν αλουμίνιο), ανοσοκατασταλτικά, ηπαρίνη κ.α.]
- Ασθένειες (υπερθυρεοειδισμός, υπερπαραθυρεοειδισμός, χρόνιες πνευμονικές ασθένειες, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, χρόνια ασθένεια ήπατος ή νεφρών, σκλήρυνση κατά πλάκας, ρευματοειδής αρθρίτιδα, χρόνιες ασθένειες του στομάχου, καρκίνος, έλλειψη βιταμίνης D, κ.ά.)
- Κάπνισμα.
- Μέγεθος σκελετού.
- Χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων/τεστοστερόνης.
- Ηλικία/γένος.
- Νευρική ανορεξία.
- Πληθυσμιακή ομάδα.
- Έλλειψη άσκησης.
- Οικογενειακό ιστορικό.

Καθώς η νόσος εξελίσσεται, παρατηρείται προοδευτική απώλεια του οστίτη ιστού με έντονη διατάραξη της αρχιτεκτονικής του (Εικόνα 12). Τα οστά γίνονται πιο εύθραυστα και λεπτά, η ανθεκτικότητα και η ελαστικότητά τους μειώνεται κι έτσι εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο κατάγματος. Η εμφάνιση των παθολογικών αυτών καταγμάτων, δηλαδή θραύσης των οστών με ασήμαντες πτώσεις ή και ακόμα χωρίς κανένα τραυματισμό, γίνεται σε προχωρημένο στάδιο του νοσήματος (Nordin, 1971).

Η οστεοπόρωση διακρίνεται σε δύο κατηγορίες (Παπακίτσου Ε.Φ., 2003): Την τοπική και τη γενικευμένη μορφή.

Στην τοπική μορφή οστεοπόρωσης ανήκουν:

- η οστεοπόρωση μετά από ακινητοποίηση καταγμάτων
- η οστεοπόρωση ή οστική ατροφία Sudeck (αλγοδυστροφία)
- η ιδιοπαθής παροδική οστεοπόρωση μιας άρθρωσης, κυρίως του ισχίου κ.ά



Εικόνα 12: Τρισδιάστατη απεικόνιση υγιούς (αριστερά) και οστεοπορωτικό οστού (δεξιά). Στο οστεοπορωτικό οστό η αρχιτεκτονική των οστικών δοκίδων είναι εμφανώς διαταραγμένη ενώ πολλές κάθετες και οριζόντιες οστικές δοκίδες είναι λεπτότερες, δείγμα της μειωμένης οστικής πυκνότητας (<http://www.visiblebody.com>).

Η γενικευμένη μορφή υποδιαιρείται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή (Παπακίτσου Ε.Φ., 2003):

Στην πρωτοπαθή οστεοπόρωση ανήκουν:

- α) Η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση
- β) Η γεροντική οστεοπόρωση
- γ) Η ιδιοπαθής οστεοπόρωση, που εμφανίζεται σε αγόρια και κορίτσια στην εφηβική ηλικία, αλλά και σε νεαρούς ενήλικες άνδρες και γυναίκες, και έχει σχετικά περιορισμένη χρονική διάρκεια

Η δευτεροπαθής οστεοπόρωση προκαλείται από συγκεκριμένη πάθηση, όπως:

- η νόσος του Cushing
- ο διαβήτης
- ο υπερπαραθυρεοειδισμός
- η χρήση κορτικοειδών
- η δρεπανοκυτταρική αναιμία
- το πολλαπλούν μυέλωμα
- η παρατεταμένη ακινητοποίηση, κ.ά.

1.2.4 Ο ρόλος του συστήματος RANKL/RANK/OPG στην ισορροπία οστεοβλαστών/οστεοκλαστών

Η ανακάλυψη του σημαντικού ρόλου του συστήματος RANKL/RANK/OPG για τη διατήρηση της ισορροπίας της οστικής μάζας έγινε στη δεκαετία του 1990. Μέχρι τότε ήταν γνωστό ότι οι οστεοκλάστες υπόκεινται στον έλεγχο των οστεοβλαστών. Το 2008 ανακαλύφθηκε ο ρυθμιστικός ρόλος της οικογένειας των TNF (Boyce B. F. & Xing L., 2008).

Πρόσφατες ανακαλύψεις έδειξαν ότι παρόλο που η σύνδεση του προσδέτη RANKL με τον υποδοχέα RANK παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική οστική ανακατασκευή, η υπερέκφραση του προσδέτη οδηγεί σε παθολογικούς φαινότυπους όπως η ψωριασική αρθρίτιδα, η ρευματοειδή αρθρίτιδα ακόμα διάφορες μορφές καρκίνου των οστών (Riggs B.L., et al, 1982).

Τα αποτελέσματα των ερευνών άνοιξαν το δρόμο για την παραγωγή ειδικών αναστολέων για τον RANKL. Η αναστολή της σύνδεσης του RANKL με τον υποδοχέα του οδηγεί σε αναστολή της οστεόλυσης, γεγονός που είναι καταλυτικό για τη διατήρηση του μεταβολισμού των οστών σε φυσιολογικά επίπεδα. Παρατηρήθηκαν όμως και ανεπιθύμητα αποτελέσματα μετά από μακροχρόνια αναστολή του RANKL (Riggs B. L. et al, 1982).

Το Denosumab (Prolia®, Amgen) είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα (IgG2) που συνδέεται με τον RANKL προλαμβάνοντας την ενεργοποίηση του υποδοχέα του στην επιφάνεια πρόδρομων οστεοκλαστών και αναστέλλει τη δράση του. Αναστέλλει δηλαδή την ωρίμανση οστεοκλαστών με αποτέλεσμα να μειώνει την οστική εναλλαγή (bone turnover), να αυξάνει την οστική πυκνότητα και να μειώνει σημαντικά τα κατάγματα σε οστεοπορωτικούς ασθενείς και γι αυτό χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια σαν ένα από τα ισχυρότερα αντιοστεοπορωτικά φάρμακα (Pageau S.C., 2009).

1.2.5 Ο ρόλος των καλπαϊνών στην ισορροπία οστεοβλαστών/οστεοκλαστών

Οι γνώσεις σχετικά με το φυσιολογικό ρόλο των καλπαϊνών παραμένουν περιορισμένες. Καθοριστική ήταν η ανακάλυψη ότι η μ-καλπαΐνη ρυθμίζει τη δράση

του RANKL (Young F., et al, 2005). Η πειραματική διαδικασία διεξήχθη με τη χρήση μακροφάγων από αίμα αρουαίου.

Μελέτες σε σειρές επιμύων με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και ανάλυση western (Murray S., et al, 1997) έδειξαν ότι οι εν λόγω πρωτεΐνες υπερεκφράζονται και παίζουν καθοριστικό ρόλο και κατά τη διαφοροποίηση των πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστοβλάστες, υπό τον έλεγχο των BMPs.

Οι Mosako et al το 2013 δημοσίευσαν μια μελέτη βασισμένη στο γεγονός ότι η CAPNS1 εμφανίζει ειδική σύνδεση με τον υποδοχέα της παραθορμόνης (PTH). Η παραθορμόνη αποτελεί ένα από τα βασικά εξωκυτάρια μηνύματα για την ωρίμανση των οστεοκλαστών από τους οστεοβλάστες (Εικόνα 7). Επιβεβαιώνοντας την ισχυρή αυτή σύνδεση, δημιούργησε knock-out ποντίκια για την CAPNS1, και παρατήρησε ότι εμφάνισαν οστεοπορωτικό φαινότυπο.

Σε οστεοπορωτικό φαινότυπο οδήγησαν και μελέτες αποσιώπησης του RANKL σε ποντίκια, ενώ knock-out ποντίκια για τα γονίδια των CAPN1/CAPNS1 και CAPN2/CAPNS2, έδωσαν πειραματόζωα με μειωμένη οστική πυκνότητα.

Συνεπώς είναι σημαντική η έρευνα για τον ακριβή εντοπισμό του ρόλου των καλπαϊνών στην ομοιόσταση των οστεοβλαστών/οστεοκλαστών, είτε σε διαδικασίες όπως η διάπλαση των οστών, η πώρωση καταγμάτων, η οστική ανακατασκευή, είτε σε παθολογικές καταστάσεις όπως η οστεοπόρωση.

*** Σκοπός της εργασίας**

Με βάση το ρόλο των καλπαϊνών στη ρύθμιση της οστικής ανακατασκευής και στη διαμόρφωση της οστικής πυκνότητας καθώς και τη συσχέτισή τους με παθολογικές καταστάσεις μεταβολισμού των οστών, όπως π.χ. η οστεοπόρωση, ο σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της πιθανής μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των καλπαϊνών 1 & 2 σε οστά επίμους τα οποία είχαν υποστεί κάταγμα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ

Σε αντίθεση με τους μαλακούς ιστούς των οργανισμών, ο οστίτης ιστός περιέχει πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται ειδικά από τα κύτταρά του (π.χ. οστεοβλάστες) και στη συνέχεια καλύπτονται από βιοαπατίτη (επιμεταλλώνονται). Έτσι, οι πρωτεΐνες των οστών είναι πολύ προστατευμένες όχι μόνο για να παρέχουν στον ιστό την απαραίτητη σκληρότητα, αλλά και για να προστατευτούν από πεπτικά ένζυμα του οργανισμού. Λόγω αυτής της δομικής ιδιαιτερότητας της φυσιολογίας του οστίτη ιστού, η μελέτη των μορίων του προϋποθέτει χρήση δραστικών πρωτοκόλλων. Το βασικότερο πρόβλημα που δημιουργείται με τα περισσότερα πρωτόκολλα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι το μικρό ποσοστό διαλυτοποίησης των πρωτεϊνών, με αποδόσεις που φθάνουν έως ~30% (Cleland T.P., et al, 2012).

Αυτές οι προκλήσεις έχουν οδηγήσει στην δοκιμή πολλών διαφορετικών πρωτοκόλλων με σκοπό την απομόνωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των οστών. Σε κάθε πειραματική διαδικασία επιλέγεται η καταλληλότερη μέθοδος. Η επιλογή αυτή βασίζεται στη φύση της πρωτεΐνης που πρόκειται να μελετηθεί (δομή, φυσικοχημικές ιδιότητες, τοπολογία κ.λπ.) και στις μεθόδους ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθούν (πέψη με θρυψίνη, ανάλυση western, ELISA κ.λπ.) (Cleland T.P., et al, 2012).

Η συνήθης διαδικασία για να επιτευχθεί απομετάλλωση του ιστού περιλαμβάνει τη χρήση είτε ενός ασθενούς ανόργανου οξέος είτε κάποιου αραιωμένου ισχυρού οξέος. Έτσι θα παραμείνει διαθέσιμη μόνο η οργανική μήτρα. Η χρήση οξέος όμως δημιουργεί κίνδυνο για υδρόλυση κάποιων από τις προς μελέτη πρωτεΐνες (Cleland T.P., et al, 2012).

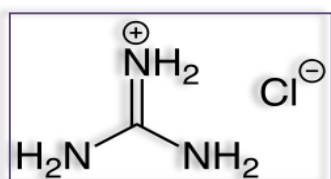
Εναλλακτικά, στο προς εξέταση επιμεταλλωμένο οστό μπορεί να προστεθεί αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) ο ρόλος του οποίου είναι κυρίως η δέσμευση ασβεστίου και η απομάκρυνσή του από την οργανική μήτρα, ελευθερώνοντας έτσι στο διάλυμα το φωσφορικό άλας από το βιοαπατίτη το οποίο ωθεί την απομετάλλωση (Cleland T. P., et al, 2012).

Σε μερικά πρωτόκολλα χρησιμοποιούνται ουρία/θειουρία και sodium-dodecyl-sulfate (SDS) για τη διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης στο οστό. Οι κίνδυνοι που ενέχονται σε αυτές τις διαδικασίες είναι η πιθανή τροποποίηση των πρωτεϊνών από το

SDS (Craig & Collins 2002, Greene & Pace 1974, Fridriksson et al, 1999) ή η καρβαμυλίωση από την ουρία (Mc Carthy, et al 2003).

Πληθώρα πρωτεϊνών είναι διαλυτές σε διττανθρακικό αμμώνιο, που έχει το πλεονέκτημα ότι αποσυντίθεται σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα και έτσι χρησιμοποιείται σε τεχνικές πέψης με ένζυμα (π.χ. θρυψίνη) χωρίς ανάγκη αφαλάτωσης (Buckley et al, 2009 & 2010, Dobberstein et al, 2009).

Επίσης για τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών των οστών χρησιμοποιείται και η υδροχλωρική γουανιδίνη (GuHCl, Εικόνα 13). Πρόκειται για παράγωγο της ουρίας, που αποτελεί έναν ισχυρό χαοτροπικό παράγοντα και έναν από τους ισχυρότερους μετουσιωτές χρησιμοποιούμενους σε φυσικοχημικές μελέτες αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Σε υψηλές συγκεντρώσεις GuHCl (π.χ. 6M), οι πρωτεΐνες χάνουν τη δομή τους και τείνουν να δημιουργούν τυχαίες δομές με τυχαίες περιελίξεις, χάνοντας τη λειτουργικότητά τους (Gerstenfeld et al 1994, Jiang et al 2007).



Εικόνα 13: Η δομή της υδροχλωρικής γουανιδίνης περιλαμβάνει ένα δίκτυο κατιόντων γουανιδίνης και ανιόντων χλωρίου τα οποία συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου.

Μετά την απομόνωση των πρωτεϊνών ακολουθεί ο χαρακτηρισμός τους με τεχνικές μοριακής βιολογίας, φασματοσκοπία μάζας, αμινοξικής ανάλυσης κ.λπ. Κάθε τεχνική απαιτεί διαφορετική καθαρότητα και συγκέντρωση πρωτεϊνών και διαφορετική προετοιμασία δείγματος.

2.1.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών από οστίτη ιστό

Στο παρόν πείραμα, μετά από δοκιμή αρκετών πρωτόκολλων απομόνωσης, παρατηρήθηκε ότι η επιθυμητή συγκέντρωση και καθαρότητα επιτεύχθηκε με ένα πρωτόκολλο που συνδυάζει τα προτεινόμενα των: Gerstenfeld et al 1994, Jiang et al, 2007, Buckley et al 2009, Buckley et al 2010.

★ Διαδικασία

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Κονιορτοποίηση των οστών και συλλογή του δείγματος σε eppendorfs (1,2gr από κάθε δείγμα)
2. Προσθήκη στα δείγματα 500μl HCl συγκέντρωσης 1,2M και ολονύκτια επώαση υπό ήπια ανάδευση στους 4°C
3. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων (10.000g, 15min, 4°C)
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
5. Τρείς πλύσεις του ιζήματος με 2ml αποστειρωμένου νερού κάθε φορά
6. Προσθήκη σε κάθε δείγμα 200μl 6M GuHCl (για την παρασκευή 45 ml διαλύματος διαλύονται 25,8gr GuHCl σε H₂O, προστίθενται 4,5ml Tris-HCl 1M και ο όγκος ρυθμίζεται με H₂O)
7. Επώαση (70h, 4°C)
8. Προσθήκη 150μl EDTA 0,5M
9. Επώαση (4h, 4°C)
10. Φυγοκέντρηση (13.000g, 15min, 4°C) και συλλογή του υπερκείμενου (~300μl)

2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Πρόκειται για μία ηλεκτροχημική μέθοδο διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων μορίων. Μέσα σε υδατικά διαλύματα και υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο μέσο ηλεκτροφόρησης (συνήθως πήκτωμα), τα μόρια κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Τα μόρια που φέρουν φορτίο λόγω ιοντισμού μετακινούνται, ανάλογα με το είδος του φορτίου, προς την άνοδο (θετικό πόλο) ή προς την κάθοδο (αρνητικό πόλο). Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μοριακών βαρών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες. Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από (Berg et al, 2002):

- Τη σταθερά pK τους
- Το μοριακό τους βάρος
- Το pH και τη συγκέντρωση του ρυθμιστικού τους διαλύματος
- Την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου
- Τη θερμοκρασία

- Τη φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτώματα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης. Η επιλογή εξαρτάται κυρίως από τα μόρια που διαχωρίζονται, από το μέγεθος του μορίου και τη διακριτική ικανότητα που απαιτείται. Το πηκτωμα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA όταν απαιτείται μεγάλη διακριτική ικανότητα και για το διαχωρισμό πρωτεϊνών (Robyt J.F. et al, 1990).

2.2.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες έχουν αρνητικό ή θετικό ολικό φορτίο ανάλογα με το pH (αμφολυτικές ιδιότητες). Η ταχύτητα μετακίνησης (u) της πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f).

Δηλαδή: $U = Ez / f$, όπου:

- U = ταχύτητα μετακίνησης μορίου σε ηλεκτρικό πεδίο
- E = ένταση του ηλεκτρικού πεδίου
- z = καθαρό φορτίο του μορίου
- f = συντελεστή τριβής (εξαρτάται από μάζα και δομή μορίου και από την πυκνότητα του μέσου)
- γινόμενο Ez = ηλεκτροστατική δύναμη που οδηγεί το μόριο

Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου μετακίνησης. Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και τη δομή του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου (Robyt J.F., et al, 1990).

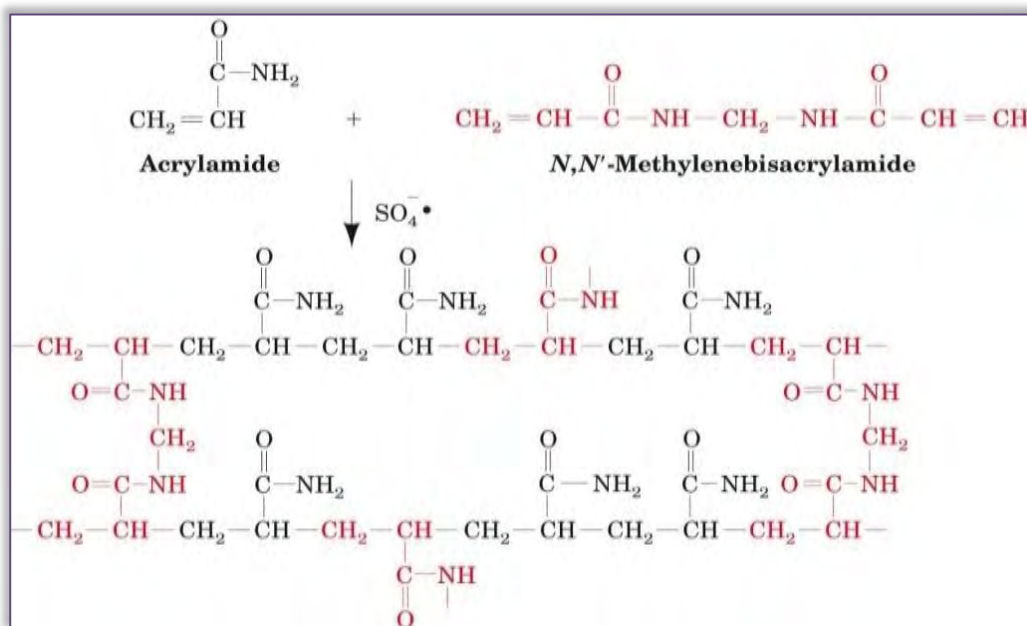
2.2.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis- SDS-PAGE)

Πρόκειται για την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη και αξιόπιστη μέθοδο διαχωρισμού πρωτεϊνικών δειγμάτων. Πραγματοποιεί διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος (δηλαδή οι πρωτεΐνες που ηλεκτροφορούνται έχουν διατηρήσει μόνο την πρωτοταγή τους δομή). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης δύο φάσεων. Το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός και επιπλέον καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για σωστό διαχωρισμό μορίων. Το πήκτωμα του πολυακρυλαμίδης είναι ένα ουδέτερο, υδρόφιλο τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης (bisacrylamide) τα οποία παίζουν συνδετικό ρόλο στο πήκτωμα. Επίσης το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων:

- του APS (υπερθειϊκό αμμώνιο, ammonium persulfate)
- του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών από το APS (Εικόνα 14)

Έτσι σχηματίζεται ένα πλέγμα, με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδης και δισακρυλαμίδης και, αφετέρου, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση της δισακρυλαμίδης ως προς την ακρυλαμίδα. Γενικά, πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.

Πρωτεΐνες με μοριακά βάρη από 10 έως 200 kDa μπορούν να διαχωριστούν σε πήκτωμα 7,5% με αναλογία ακρυλαμίδης/δισακρυλαμίδης ίση με 30:0,8, ενώ πρωτεΐνες μεγαλύτερων μεγεθών χρειάζονται μικρότερες συγκεντρώσεις ακρυλαμίδης. Αντιστρόφως, για το διαχωρισμό μικρότερων πολυπεπτιδίων χρησιμοποιούνται πηκτώματα περιεκτικότητας μέχρι και 30%.



Εικόνα 14: Πολυμερισμένα μόρια ακρυλαμίδης κατά τη δημιουργία πηκτώματος. Το ποσοστό ακρυλαμίδης:δισακρυλαμίδης καθώς και η συνολική συγκέντρωση των δύο συστατικών επηρεάζει το μέγεθος των πόρων και την ευκαμψία του πηκτώματος.

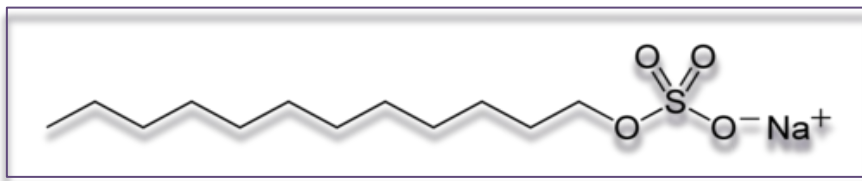
Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού του Laemmli (1970) παρασκευάζεται ένα πήκτωμα δύο φάσεων:

- Το πήκτωμα ευθυγράμμισης (η επάνω φάση) έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης, επομένως μεγαλύτερους πόρους και το pH του είναι ίσο με 6,8
- Το πήκτωμα διαχωρισμού (κάτω φάση) είναι πυκνότερο, συνεπώς έχει μικρότερους πόρους, και το pH του είναι ίσο με 8,8

Η διαφορετική σύσταση στις δύο φάσεις του πηκτώματος εξασφαλίζει ότι τα δείγματα αρχικά θα συγκεντρωθούν (θα ευθυγραμμιστούν) στο όριο του πρώτου πηκτώματος δημιουργώντας μία ενιαία ζώνη και στη συνέχεια θα εισέλθουν στο δεύτερο πήκτωμα, όπου θα διαχωριστούν, με αποτέλεσμα όλα τα δείγματα να αρχίσουν να αναλύονται και να διαχωρίζονται από το ίδιο σημείο, χωρίς ο διαχωρισμός αυτός να επηρεάζεται από τη συγκέντρωση και τον όγκο του προς ανάλυση δείγματος, παρά μόνο από το καθαρό του φορτίο. Η μετακίνηση των μορίων βάσει του καθαρού τους φορτίου εξηγείται λαμβάνοντας υπόψη τις ιδιότητες της

γλυκίνης που περιέχεται στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (βλ. παρακάτω).

Στο πήκτωμα, στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης, καθώς και στο διάλυμα Laemli που προστίθεται στα δείγματα, περιέχεται SDS. Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο διασπά τους υδρογονικούς δεσμούς και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα την αποδιάταξη των πρωτεϊνών (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Η πρωτοταγής δομή του SDS. Παρατηρείται ο υδρόφοβος ανθρακικός σκελετός και το τελικό υδρόφιλο τμήμα του μορίου. Το υδρόφοβο τμήμα του συνδέεται με το υδρόφοβο τμήμα των πρωτεϊνών, οπότε τις αποδιατάσσει και τις φορτίζει αρνητικά.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζει ότι θα γίνει ανάλυση όλων των πρωτεϊνών του δείγματος, καθώς μετά την επεξεργασία τους με SDS θα κινηθούν όλες προς το ίδιο ηλεκτρόδιο, οπότε δε θα χαθούν πρωτεΐνες με ισοηλεκτρικό σημείο μεγαλύτερο του 6,8, οι οποίες θα κινούνταν προς τον αντίθετο πόλο.

Στα δείγματα προστίθεται διάλυμα Laemli το οποίο περιέχει την αναγωγική ουσία μερκαπτοαιθανόλη, η οποία αποδιατάσσει τους δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στις κυστεΐνες των πρωτεϊνών και συμβάλλει στην πλήρη μετουσίωσή τους. Στο διάλυμα επίσης περιέχεται SDS το οποίο εκτός από τα ήδη προαναφερθέντα, μειώνει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και τη δημιουργία συμπλόκων. Απαραίτητη είναι η ύπαρξη της οργανικής ουσίας Tris-HCl, η οποία ρυθμίζει το pH του δείγματος στο 6,8. Η γλυκερόλη βοηθά το δείγμα να βυθιστεί στα πηγάδια του πηκτώματος. Τέλος, το μπλε της βρωμοφαινόλης, που είναι μία χρωστική με αρνητικά φορτισμένα μόρια, μετακινείται και χρησιμοποιείται ως ένδειξη για την πορεία της ηλεκτροφόρησης.

Όταν το ρυθμιστικό διάλυμα για τα δείγματα είναι Tris-HCl, στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιείται Tris-HCl και γλυκίνη. Σε pH ίσο με 6,8 (πήκτωμα ευθυγράμμισης), η γλυκίνη είναι διπολικό ιόν, καθώς η τιμή pKa της είναι αρκετά υψηλότερη από την αντίστοιχη του πηκτώματος, συνεπώς η κινητικότητα των μορίων της είναι πολύ χαμηλή. Τα ιόντα Cl⁻ έχουν υψηλότερη κινητικότητα και προηγούνται, αλλά δε μπορούν να απομακρυνθούν καθώς αφήνουν πίσω τους θετικά ιόντα. Δημιουργείται λοιπόν μία επιθυμητή διαφορά δυναμικού που σε συνδυασμό με τους αρκετά μεγάλους πόρους του πηκτώματος ευθυγράμμισης, που διευκολύνουν την κίνηση, ευνοούν στο να παγιδευτεί το δείγμα στο πήκτωμα ευθυγράμμισης. Έτσι δημιουργείται μια λεπτή ζώνη ευθυγράμμισης στο όριο των πηκτωμάτων, δημιουργώντας προδιαγραφές ισοταχούς ηλεκτροφόρησης.

Όταν η ζώνη αυτή εισέλθει στο διάλυμα διαχωρισμού, το οποίο έχει μεγαλύτερο pH (8,8) και μικρότερους πόρους, η κινητικότητα του δείγματος μειώνεται κατά πολύ και αυτή των μορίων της γλυκίνης αυξάνεται. Έτσι η γλυκίνη τα προσπερνά και από το σημείο αυτό ξεκινά ο διαχωρισμός των μορίων του δείγματος (βάσει μόνο του καθαρού τους φορτίου όπως αναφέρθηκε παραπάνω).

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί χρώση των πηκτωμάτων. Η χρώση των πολυπεπτιδίων στο πήκτωμα πραγματοποιείται με διάλυμα coomassie brilliant blue. Πρόκειται για την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη χρωστική για πρωτεΐνες, με διακριτική ικανότητα από 30 έως 100ng πρωτεΐνης. Είναι ανιονική ουσία με δομή μη πολική. Δεσμεύεται με τα θετικά φορτισμένα αμινικά άκρα των πρωτεϊνών, μέσω δεσμών Van der Waals και ιονικών αλληλεπιδράσεων. Το διάλυμα χρώσης περιέχει εκτός από τη χρωστική, μεθανόλη και οξικό οξύ για τη μονιμοποίηση των δειγμάτων. Κατά τη χρώση, ο όγκος του διαλύματος πρέπει να καλύπτει το πήκτωμα (δηλ. ο όγκος του να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερος από τον όγκο του πηκτώματος).

Με το πέρας της χρώσης το πήκτωμα ξεπλένεται με νερό, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής που δεν έχει προσδεθεί σε πρωτεΐνες, και ακολουθεί η επώασή του σε διάλυμα αποχρωματισμού. Αυτό είναι ίδιο με το διάλυμα χρώσης, χωρίς την προσθήκη χρωστικής. Προαιρετική είναι η προσθήκη γλυκερόλης, εάν είναι επιθυμητή η αποξήρανση του πηκτώματος.

☛ *Σύσταση διαλυμάτων*

- I. Πήκτωμα διαχωρισμού: συγκέντρωση 10%
 - 5,4 ml H₂O
 - 4,5 ml Tris-Cl 1,25M , pH=8,8
 - 75 μl SDS (τελική συγκέντρωση 20%)
 - 5ml διάλυμα ακρυλαμίδης/δισακρυλαμίδης σε αναλογία 29:1 gr /100ml
 - 75 μl APS (τελική συγκέντρωση 0,4%)
 - 7,5 μl TEMED (τελική συγκέντρωση 0,02%)
- II. Πήκτωμα ευθυγράμμισης: συγκέντρωση 4,5%
 - 7,4 ml H₂O
 - 1 ml Tris-Cl 1,25M , pH=6,8
 - 50 μl SDS (τελική συγκέντρωση 20%)
 - 1,5 ml διάλυμα ακρυλαμίδης/δισακρυλαμίδης σε αναλογία 29:1 gr /100ml
 - 50 μl APS (τελική συγκέντρωση 0.4%)
 - 20 μl TEMED (τελική συγκέντρωση 0.05%)
- III. Διάλυμα Laemli (5x) :
 - Tris 200mM, pH=6,8
 - SDS 8%
 - Γλυκερόλη 40%
 - Μερκαπτοαιθανόλη 20%
 - Μπλε της βρωμοφαινόλης 0,4%
- IV. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (10x):
 - 250mM Tris-Cl
 - 1,92M γλυκίνη
 - 1% SDS
 - Ρύθμιση του pH στο 8,3 με αραιό HCl
 - Χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1x
- V. Διάλυμα χρώσης:
 - 45% v/v μεθανόλη
 - 10% v/v οξικό οξύ
 - 0,25% χρωστικής coomassie brilliant blue g-250

VI. Διάλυμα αποχρωματισμού :

- 30% v/v μεθανόλη
- 10% v/v οξικό οξύ
- 3% v/v γλυκερόλη (προαιρετικά)

* *Διαδικασία*✓ *Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου*

1. Συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης
2. Παρασκευή πηκτώματος διαχωρισμού. Πρώτα προστίθεται το νερό. Ακολουθεί το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, το SDS και το διάλυμα ακρυλαμίδης/δισακρυλαμίδης. Τέλος, υπό ανάδευση, προστίθεται το APS και το TEMED
3. Μεταφορά του παραπάνω μίγματος στη συσκευή (ανάμεσα στις γυάλινες επιφάνειες) με πιπέτα Pasteur μέχρι τα 2/3 του συνολικού όγκου
4. Προσθήκη ισοπροπανόλης στην επιφάνεια του πηκτώματος χωρίς να διαταραχθεί η επιφάνειά του. Η ισοπροπανόλη απομακρύνεται και ξεπλένεται με νερό μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος (10–15 min)
5. Το υπόλειμμα νερού απομακρύνεται με χρήση διηθητικού φίλτρου whatman
6. Παρασκευή του πηκτώματος ευθυγράμμισης. Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων είναι ίδια με εκείνη στο πήκτωμα διαχωρισμού
7. Μεταφορά του μίγματος στη συσκευή, όπως ακριβώς πραγματοποιήθηκε και με το πήκτωμα διαχωρισμού
8. Προσθήκη της κατάλληλης χτένας
9. Το πήκτωμα θα πρέπει να πολυμεριστεί για περίπου 30 min προτού χρησιμοποιηθεί

✓ *Προετοιμασία δειγμάτων:*

1. Προσθήκη διαλύματος Laemli σε κάθε δείγμα
2. Θέρμανση των δειγμάτων για πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών, 95°C, 5 min
3. Σύντομη φυγοκέντρηση με σκοπό την καθίζηση των αδιάλυτων ουσιών, ώστε αυτές να μην επηρεάσουν αρνητικά την ανάλυση

✓ Φόρτωση δειγμάτων

1. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
2. Προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος ηλεκτροφόρησης Tris–Glycine/SDS
3. Αφαίρεση της χτένας και πλύσιμο των υποδοχέων του πηκτώματος.
Απομάκρυνση φυσαλίδων
4. Τοποθέτηση των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένου και μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους) στις υποδοχές του πηκτώματος με μικροπιπέτα
5. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων στα ~20mA

✓ Χρώση του πηκτώματος

1. Χρώση πηκτώματος με ολονύκτια ήπια ανάδευση σε διάλυμα χρώσης
2. Αποχρωματισμός πηκτώματος (3 πλύσεις με H₂O και προσθήκη διαλύματος αποχρωματισμού το οποίο ανανεώνεται)

2.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στο ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465nm όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται στα 595nm όταν η χρωστική είναι προσδεδεμένη σε πρωτεΐνη. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη διότι ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλέγματος πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερός σε μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων. Η ένταση του χρώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα (Bradford, 1976).

2.3.1 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης

Για να γίνει η ποσοτικοποίηση μιας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα, αρχικά κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία δημιουργείται με το προσδιορισμό της απορρόφησης της Bovine Serum Albumin (BSA) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα BSA και η απορρόφηση μετράται στα 595 nm (Bradford, 1976).

Από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία σχεδιάζεται με βάση την απορρόφηση των διαλυμάτων της BSA, υπολογίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος. Η εξίσωση της ευθείας, η οποία προκύπτει είναι της μορφής: $y = ax + \beta$, όπου το y αντιπροσωπεύει την οπτική απορρόφηση στα 595nm, x είναι η ποσότητα της πρωτεΐνης στο δείγμα. Λύνοντας την παραπάνω εξίσωση ως προς x , προκύπτει: $x = (y - \beta) / \alpha$. Το αποτέλεσμα που εξάγεται από τη σχέση αυτή διαιρείται με τον όγκο του δείγματος. Βάσει των υπολογισμών αυτών, είναι δυνατόν να υπολογίσουμε περιεκτικότητες πρωτεϊνικών διαλυμάτων.

Για να γίνει αποδεκτή η εξίσωση θα πρέπει να υπολογιστεί ο συντελεστής συσχέτισης R , που αποτελεί δείκτη για την ποιότητα της ευθείας η οποία έχει δημιουργηθεί. Ο R εκφράζει τον τρόπο με τον οποίο σχετίζονται οι δύο μεταβλητές της ευθείας και παίρνει τιμές από -1 έως +1 (για $R=1$ υπάρχει τέλεια θετική συσχέτιση μεταξύ των X και Y , για $R=0$: δεν υπάρχει καμία γραμμική συσχέτιση μεταξύ των X και Y , ενώ για $R=-1$ υπάρχει τέλεια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των X και Y). Για τη μέθοδο Bradford δεκτές γίνονται οι ευθείες όπου $R > 0,9$. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για το άγνωστο δείγμα (Robyt, et al, 1990).

2.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την καμπύλη βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων BSA (ειδικότερα προστέθηκαν 5, 15, 25, 35, 50, 60, 70, 80, 90 και 100μl BSA συγκέντρωσης 1mg/ml σε νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 400μl) και στη συνέχεια προστέθηκαν 100μl αντιδραστηρίου Bradford (Bio-rad, # 500-0006).

Επιπλέον, παρασκευάζονται και τα δείγματα προς ανάλυση (χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αραιώσεις δείγματος σε τελικό όγκο 400μl ώστε η τιμή που προέκυπτε από την Bradford να είναι μέσα στα όρια της πρότυπης καμπύλης). Στη συνέχεια προστέθηκαν 100μl αντιδραστηρίου Bradford. Επίσης παρασκευάζεται και ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου, το οποίο δεν περιέχει καθόλου πρωτεΐνη (400μl H₂O και 100μl αντιδραστηρίου Bradford).

Όλα τα παραπάνω δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 595 nm. Η μέτρηση όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε χρονικό όριο μιας ώρας.

*** Διαδικασία:**

1. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων BSA
2. Φωτομέτρηση στα 595nm
3. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης
4. Παρασκευή διαλυμάτων δειγμάτων
5. Φωτομέτρηση στα 595nm
6. Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα βάσει της πρότυπης καμπύλης

2.4 Η ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, Ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση)

Πρόκειται για μία ομάδα ευρέως χρησιμοποιούμενων ανοσολογικών τεχνικών οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία. Δίνουν την ικανότητα ποσοτικού προσδιορισμού του αντιγόνου/αντισώματος. Ο ποιοτικός προσδιορισμός αναφέρεται στην ύπαρξη-απουσία μορίου-στόχου, ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) ή της απορρόφησης του δείγματος και σύγκριση με πρότυπη καμπύλη, όπου στον άξονα y αναγράφονται οι απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης και στον x οι συγκεντρώσεις τους. Από την τιμή της απορρόφησης που προκύπτει από τη μέτρηση κάθε δείγματος, υπολογίζεται η συγκέντρωσή του, βάσει της πρότυπης καμπύλης (Madigan et al, 2010).

2.4.1 Αρχή της μεθόδου

Για την πραγματοποίηση των συγκεκριμένων τεχνικών απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη ενός τουλάχιστον αντισώματος με εξειδίκευση σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, λόγω του γεγονότος ότι οι τεχνικές ELISA, βασίζονται στη χρήση εξειδικευμένων ενζύμων τα οποία προσδένονται ομοιοπολικά σε μόρια αντισωμάτων, με τρόπο ώστε να διατηρούνται οι καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων και η εξειδίκευση του αντισώματος. Έτσι, προκύπτει ειδική σύνδεση αντιγόνου-

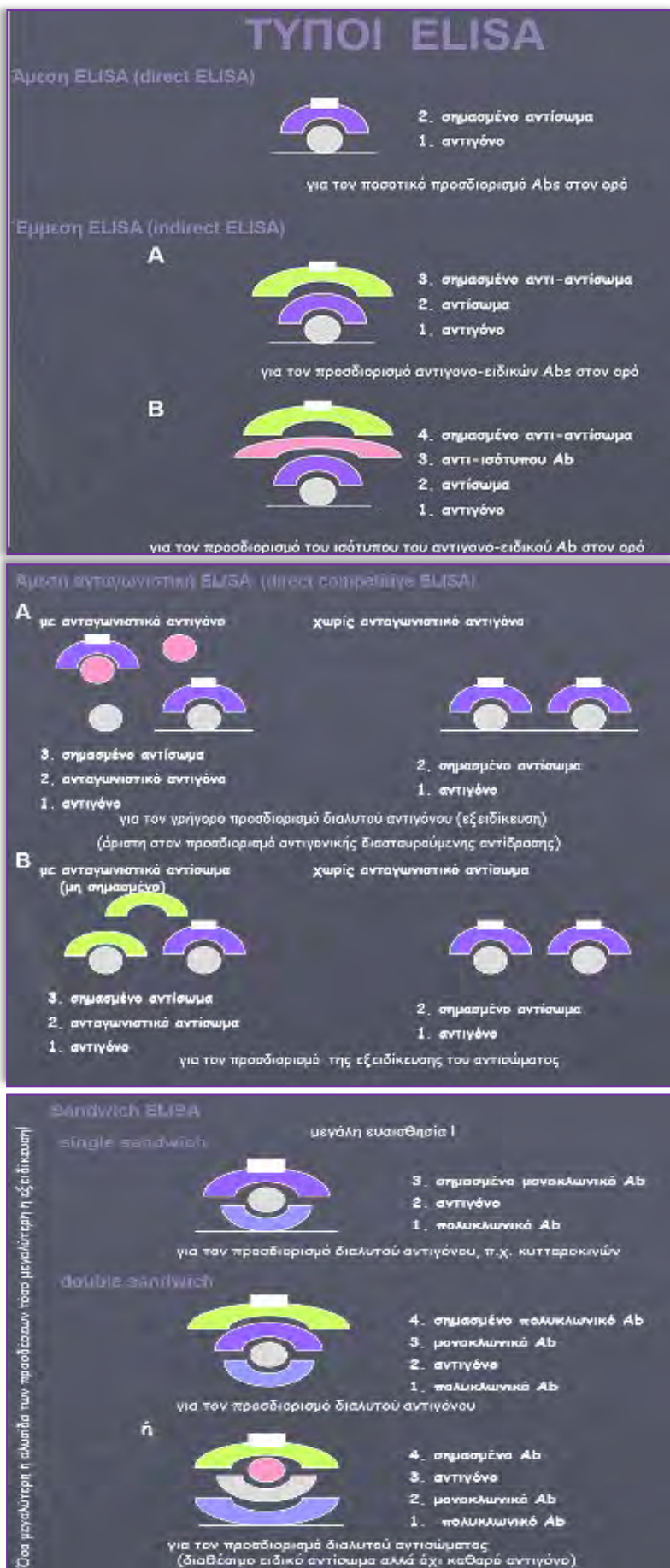
αντισώματος, τα οποία δημιουργούν ένα σύμπλοκο που εύκολα μπορεί να απομονωθεί από τα υπόλοιπα μόρια στο δείγμα. Σε πρώτο στάδιο, το δείγμα με έναν άγνωστο αριθμό αντιγόνων ακινητοποιείται πάνω σε μία στερεή βάση/πλάκα. Έπειτα προστίθεται το κατάλληλο αντίσωμα ανίχνευσης για το είδος των αντιγόνων του δείγματος σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να είναι ομοιοπολικώς συνδεδεμένο με ένα ένζυμο ή μπορεί να ανιχνευθεί με τη σειρά του από ένα δευτερεύον αντίσωμα συνδεδεμένο με ένα ένζυμο με βιο-σύζευξη. Ανάμεσα σε κάθε στάδιο, η πλάκα ξεπλένεται ώστε να απομακρυνθούν πρωτεΐνες ή αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν. Μετά το τελικό στάδιο πλύσης, προστίθεται στην πλάκα ένα ενζυμικό υπόστρωμα για να παράγει ένα σήμα, το οποίο υποδεικνύει την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Το σήμα αυτό είναι συνήθως η αλλαγή χρώματος του υποστρώματος, μέσω της ενζυμικής κατάλυσης και της ειδικής αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος. Η ποσότητα χρώματος που παράγεται, χρησιμεύει στο να υπολογίζεται η ποσότητα του ενζύμου που προστέθηκε.

Συνοπτικά, τα βήματα της ανάλυσης έχουν ως εξής:

- Το προς εξέταση αντιγόνο προσκολλάται σε πλαστική επιφάνεια (sorbent)
- Το αντιγόνο αναγνωρίζεται από το ειδικό προς αυτό αντίσωμα (immuno)
- Το αντίσωμα αυτό με τη σειρά του αναγνωρίζεται από δεύτερο αντίσωμα (immuno) το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένζυμο (enzyme-linked)
- Υπόστρωμα αντιδρά με το ένζυμο για να παράγει προϊόν, συνήθως έγχρωμο (Madigan et al, 2010)

2.4.2 Οι βασικές κατηγορίες ELISA

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές παραλλαγές των τεχνικών ανοσοπροσρόφησης [άμεση ή έμμεση, ανταγωνιστική ή μη-ανταγωνιστική (elisa sandwich)]. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μη ανταγωνιστικής ELISA (sandwich) (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Στην ανταγωνιστική ELISA ο σημασμένος ιχνηθέτης είναι το ίδιο το αντιγόνο, το οποίο ανταγωνίζεται με το προς μέτρηση αντιγόνο για σύνδεση με περιορισμένη ποσότητα του ίδιου αντισώματος. Τα αποτελέσματα της μέτρησης είναι αντιστρόφως ανάλογα της συγκέντρωσης του αντιγόνου στο δείγμα. Αντίθετα, στη μέθοδο της μη ανταγωνιστικής ELISA, το αντιγόνο προσροφάται αρχικά σε ένα μη σημασμένο αντίσωμα το οποίο είναι καθηλωμένο σε μία στερεή επιφάνεια και στη συνέχεια προστίθεται το ίδιο σημασμένο αντίσωμα. Με αυτή τη διαδικασία τα αποτελέσματα από τη μέτρηση είναι ανάλογα της συγκέντρωσης του αντιγόνου στο δείγμα (Χαϊκάλη, 2010).

☛ *Σύσταση διαλυμάτων:*

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 2 kit

1. E95258 Hu 96 tests enzyme-linked immunosorbent assay kit for calpain, smalls ubunit 1 (CAPNS1). Organism: Homo sapiens (human) της εταιρείας Usnc
2. E95253 Hu 96 tests enzyme-linked immunosorbent assay kit for calpain, small subunit 2 (CAPNS2). Organism: Homo sapiens (human) της εταιρείας Usnc

Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν ως εξής σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (και για τα δύο kit η διαδικασία είναι κοινή):

I. Standard solution

- Στο kit υπάρχει λυοφιλοποιημένο το standard (δηλαδή η πρωτεΐνη capns1 ή capns2) και το standard diluent (διαλύτης για την πρωτεΐνη)
- Δημιουργήθηκε το standard solution με διαλυτοποίηση του standard σε 1ml standard diluent. Η συγκέντρωση του διαλύματος σε capns1 ή capns2 ήταν 20ng/ml
- Πραγματοποιούνται 7 διαδοχικές αραιώσεις των 500 μl του standard solution. Έτσι δημιουργούνται 8 δείγματα με συγκεντρώσεις πρωτεΐνης: 20ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml, 2,5ng/ml, 1,5ng/ml, 0,625ng/ml, 0,312ng/ml, 0ng/ml (τυφλό)

II. *Detection Reagent A*

- Ανάμειξη 400μl assay diluent A (διαλύτης) με 400 μl dH₂O
- Από το παραπάνω διάλυμα μεταφέρονται σε νέο σωλήνα 792 μl τα οποία αναμειγνύονται με 8 μl detection reagent A (πρώτο αντίσωμα, συνδεδεμένο με βιοτίνη, που αναγνωρίζει την capns1 ή capns2)

III. *Detection Reagent B*

- Ανάμειξη 400 μl assay diluent B (διαλύτης) με 400 μl dH₂O
- Από το παραπάνω διάλυμα μεταφέρονται σε νέο σωλήνα 792 μl τα οποία αναμειγνύονται με 8 μl detection reagent B (αβιδίνη-η οποία αναγνωρίζει τη βιοτίνη-συνδεδεμένη με το ένζυμο horse radish peroxidase HRP)

IV. *Wash solution (1x)*

- Ανάμειξη 22,33 ml dH₂O με 770 μl wash buffer (διάλυμα πλύσης)

V. *Substrate solution*

- Χρησιμοποιείται το TMB substrate (υπόστρωμα του HRP το οποίο θα δημιουργήσει έγχρωμο μπλε προϊόν) χωρίς αραιώση, όπως περιέχεται στο kit

VI. *Stop Solution*

- Χρησιμοποιείται χωρίς αραιώση, όπως περιέχεται στο kit (sulphuric acid που προκαλεί τερματισμό της αντίδρασης)

★ *Διαδικασία:*

1. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν οι απαιτούμενες αραιώσεις του δείγματος ελέγχου (όπως αναφέρθηκαν παραπάνω)
2. Χρησιμοποιήθηκαν 7 πηγάδια για τα standard solution και 1 για το τυφλό διάλυμα
3. Τοποθετήθηκε ίδια ποσότητα (mg/ml) ολικών πρωτεϊνών από κάθε δείγμα στα πηγάδια

4. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 2h στους 37°C ώστε να γίνει η σύνδεση του αντιγόνου των δειγμάτων με το αντίσωμα το οποίο είναι προσδεμένο στα πηγάδια
5. Ακολούθως, απομακρύνθηκαν τα δείγματα από τα πηγάδια, προσεκτικά με χρήση πιπέτας
6. Προστέθηκαν 100 µl detection reagent A σε κάθε πηγάδι
7. Ακολουθεί επώαση για 1h στους 37°C για να πραγματοποιηθεί η σύνδεση του αντισώματος που υπάρχει στο detection reagent A με το αντιγόνο που ήδη έχει συνδεθεί στη μικροπλάκα
8. Αναρρόφηση του υγρού προσεκτικά ώστε να μην παραμείνουν υπολείμματα στα πηγάδια
9. Πλύση με 350 µl wash solution 1x
10. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2min
11. Προσθήκη 100 µl detection reagent B και επώαση για 20min στους 37°C ώστε να γίνει η σύνδεση βιοτίνης-αβιδίνης
12. Πλύσεις με wash solution
13. Προσθήκη 90µl substrate solution και επώαση στο σκοτάδι για 15min. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιείται η αντίδραση της HRP με το υπόστρωμα και γι αυτό το υγρό σε κάθε πηγάδι άρχισε να γίνεται μπλε
14. Προσθήκη σε κάθε πηγάδι 50 µl από το Stop Solution. Έτσι έχουμε τερματισμό της αντίδρασης του ενζύμου και το υγρό σε κάθε πηγαδάκι έγινε κίτρινο
15. Προσδιορισμός της απορρόφησης. Για την μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm χρησιμοποιείται ειδικό φωτόμετρο για ELISA.

επανάληψη των βημάτων 9
και 10, 3 φορές

επανάληψη των βημάτων 9
και 10, 5 φορές

2.5 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΣΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ

Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μακρά οστά ποδιού από 17 επίμυες. Για κάθε ζώο υπήρχαν 2 δείγματα: οστό φυσιολογικό και οστό με κάταγμα. Τα δείγματα κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες με βάση το χρόνο θανάτωσής τους (και συλλογής του οστού) μετά το κάταγμα (Πίνακας 3). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε τόσο σε ανήλικα (Ομάδες Α και Ε, Πίνακας 3) όσο και σε ενήλικα ζώα (Ομάδα Εν, Πίνακας 3). Τα δείγματα προέρχονται από το Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας και Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ.

Πίνακας 3: Δείγματα επίμυων

Ομάδα	Αριθμός Δειγμάτων Φυσιολογικά (Φ)/με κάταγμα (Κ)	Χρόνος θανάτωσης μετά το κάταγμα
Α	Φ: Α ₁ , Α ₂ , Α ₃ , Α ₄ , Α ₅	24 ώρες
	Κ: Α ₁ , Α ₂ , Α ₃ , Α ₄ , Α ₅	
Ε	Φ: Ε ₁ , Ε ₂ , Ε ₃ , Ε ₄ , Ε ₅ , Ε ₆ , Ε ₇ , Ε ₈	24 μέρες
	Κ: Ε ₁ , Ε ₂ , Ε ₃ , Ε ₄ , Ε ₅ , Ε ₆ , Ε ₇ , Ε ₈	
Εν	Φ: Εν ₁ , Εν ₂ , Εν ₃ , Εν ₄	18 μέρες
	Κ: Εν ₁ , Εν ₂ , Εν ₃ , Εν ₄	

2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Εκτιμήθηκε η τυπική απόκλιση κάθε ομάδας δειγμάτων:

- Εν: Ενήλικα χωρίς/με κάταγμα, 18 μέρες
- Α: Ανήλικα χωρίς/με κάταγμα, 24 ώρες
- Ε: Ανήλικα χωρίς/με κάταγμα, 24 μέρες

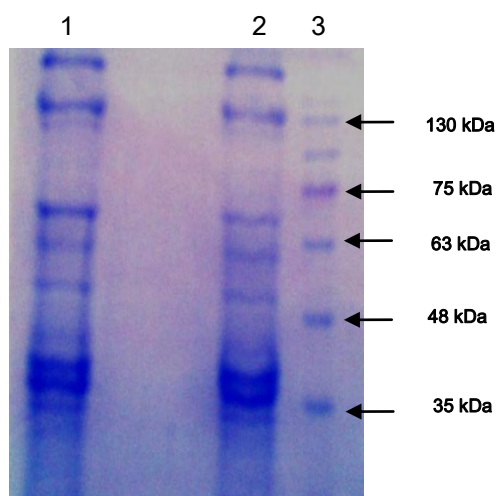
Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση μη-παραμετρικά (mann-whitney test), χρησιμοποιώντας ως όριο σημαντικότητας την τιμή $p \leq 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΟΣΤΑ ΕΠΙΜΥΩΝ

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 17 ζευγάρια από γόνατα ανήλικων και ενήλικων επίμυων (ένα φυσιολογικό και ένα μετά από κάταγμα, Πίνακας 3). Για την απομόνωση των πρωτεϊνών από τα οστά επιλέχθηκε ένα πρωτόκολλο που συνδυάζει μεθοδολογίες διαφορετικών δημοσιεύσεων (Jiang et al 2007, Buckley et al 2010) καθώς με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε η μέγιστη απόδοση και ακεραιότητα των πρωτεϊνών.

Ο έλεγχος των ολικών πρωτεϊνών που απομονώθηκαν με τις διάφορες μεθοδολογίες γινόταν με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ενδεικτικά στην Εικόνα 17 φαίνεται το αποτέλεσμα για έξι δείγματα, ακολουθώντας το τροποποιημένο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε. Το αποτέλεσμα κρίθηκε ικανοποιητικό και γι' αυτό εφαρμόστηκε σε όλα τα επόμενα δείγματα.



Εικόνα 17: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα οστών. Φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE και χρώσης με Coomassie blue ενδεικτικά για 2 δείγματα (1, 2) από οστά με (1) ή χωρίς (2) κάταγμα. Στην διαδρομή 3 φαίνεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (BlueStar Prestained Marker, Nippon).

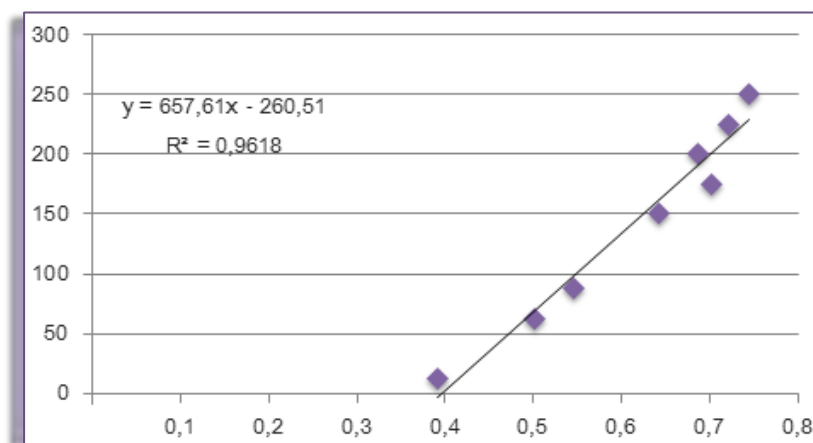
3.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD

Το επόμενο βήμα ήταν η εκτίμηση της συγκέντρωσης σε πρωτεΐνες όλων των δειγμάτων, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Αρχικά κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης με BSA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση κάθε δείγματος στα 595nm. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Η συγκέντρωση σε BSA (μg/ml) και η αντίστοιχη οπτική απορρόφηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Οπτική απορρόφηση (A)	Συγκέντρωση BSA (μg/ml)
0,392	12,5
0,501	62,5
0,546	87,5
0,643	150
0,702	175
0,687	200
0,722	225
0,744	250

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 4, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς και δημιουργήθηκε η αντίστοιχη εξίσωση (Εικόνα 18) βάση της οποίας υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις όλων των δειγμάτων σε πρωτεΐνη. Προφανώς οι συγκεντρώσεις διέφεραν (20-100mg/ml) και γι αυτό χρησιμοποιήθηκαν και διαφορετικοί όγκοι από το κάθε δείγμα για την ELISA.



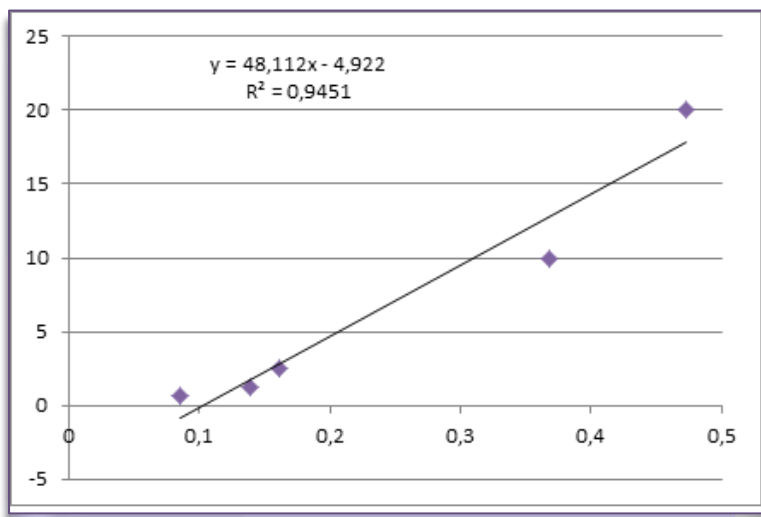
Εικόνα 18: Η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης με βάσει διαφορετικές συγκεντρώσεις BSA.

3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΚΑΛΠΑΪΝΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ELISA

Κατά το χρωματομετρικό προσδιορισμό με τη μέθοδο ELISA χρησιμοποιήθηκαν 2kit με αντισώματα για την ανθρώπινη CAPNS1 και CAPNS2. Σε κάθε πηγάδι της μικροπλάκας τοποθετήθηκε ίση ποσότητα πρωτεΐνης και οι όγκοι ρυθμίστηκαν με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ελέγχου (γνωστής συγκέντρωσης σε καλπαΐνη) βάσει των οποίων δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη για την ELISA [για την μέτρηση της CAPNS1 (258nm) οι τιμές συγκέντρωσης και απορρόφησης φαίνονται στον Πίνακα 5 και η πρότυπη καμπύλη στην Εικόνα 19. Τα αντίστοιχα δεδομένα για την CAPNS2 (358nm) φαίνονται στον Πίνακα 6 και στην Εικόνα 20].

Πίνακας 5: Τιμές συγκέντρωσης (ng/ml) και απορρόφησης στα 258nm για την CAPNS1

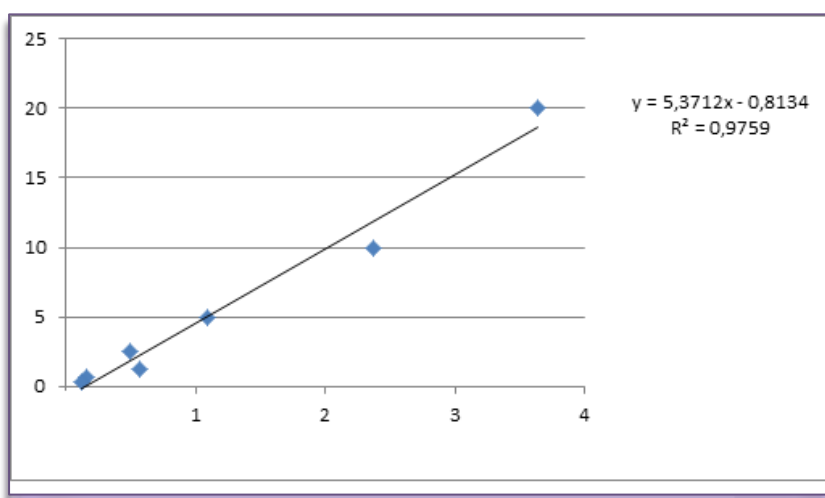
Απορρόφηση	Συγκέντρωση CAPNS1 (μg/ml)
0,473	20
0,368	10
0,161	2,5
0,139	1,25
0,085	0,625



Εικόνα 19: Πρότυπη καμπύλη για την ELISA για την μέτρηση της CAPNS1.

Πίνακας 6: Τιμές συγκέντρωσης και απορρόφησης στα 358nm για την CAPNS2

Απορρόφηση	Συγκέντρωση CAPNS2 (ng/ml)
3,628	20
2,375	10
1,097	5
0,493	2,5
0,566	1,25
0,162	0,625
0,126	0,312



Εικόνα 20: Πρότυπη καμπύλη για την ELISA για την μέτρηση της CAPNS2

Οι τιμές απορρόφησης που προέκυψαν από την ELISA μετατράπηκαν σε τιμές συγκέντρωσης σε καλπαΐνη 1 ή 2 (ng/ml) με βάση τις εξισώσεις των πρότυπων καμπύλων (Εικόνες 19 και 20). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Τιμές συγκέντρωσης σε καλπαΐνη 1 και 2 (ng/ml).

Κωδικός Δείγματος	CAPNS1 Φυσιολογικό– συγκέντρωση (ng/ml)	CAPNS1 Κάταγμα– συγκέντρωση (ng/ml)	CAPNS2 Φυσιολογικό - συγκέντρωση (ng/ml)	CAPNS2 Κάταγμα – συγκέντρωση (ng/ml)
Ev1	10.228	14.812	17.249	8.608
Ev2	-	1.665	-	3.939
Ev3	10.776	5.670	3.252	4.518
Ev4	14.624	19.198	20.010	24.838
A1	6.541	5.07	4.149	2.886
A2	8.753	8.628	9.562	2.601
A3	21.657	-	4.111	-
A4	18.156	9.345	3.928	7.179
A5	-	-	5.271	1.375
E1	0.466	-	1.559	-
E2	3.625	6.907	6.315	16.552
E3	16.691	-	4.812	-
E4	3.419	1.373	5.359	3.056
E5	1.501	3.882	2.507	9.754
E6	0.385	5.895	2.091	12.821
E7	3.003	0.737	11.860	2.122
E8	5.878	0.383	11.447	2.202

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8. Για την ανάλυση, τα δείγματα ίδιας ηλικίας και ίδιου χρόνου ανάλυσης μετά το κάταγμα ομαδοποιήθηκαν σε αυτά που είχαν υποστεί κάταγμα και σε αυτά χωρίς κάταγμα. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος της συγκέντρωσης σε καλπαΐνη και η τυπική απόκλιση και έγινε η συγκριτική ανάλυση.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των καλπαϊνών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων δειγμάτων, δηλαδή δεν υπάρχουν ενδείξεις για μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των καλπαϊνών μετά από κάταγμα, τουλάχιστον στους χρόνους που μελετήθηκαν. Αξίζει να σημειωθεί το σχετικά μεγάλο εύρος της τυπικής απόκλισης όπως φαίνεται σε όλες τις ομάδες ανάλυσης.

Πίνακας 8: Στατιστική ανάλυση (mann-whitney test), με όριο σημαντικότητας $p \leq 0.05$.

ομάδα ανάλυσης	CALPAIN 1 Μέση Τιμή±ΤΑ*	P	CALPAIN 2 Μέση Τιμή±ΤΑ*	P
Ενήλικα φυσιολογικά (φ) σε σχέση με κάταγμα (κ)	(φ)11.876±2.395 (κ)13.226±6.901	0.4	(φ)13.504±8.985 (κ)12.655±10.748	0.5
Ανήλικα (24h) φυσιολογικά (φ) σε σχέση με κάταγμα (κ)	(φ)11.15±6.167 (κ) 7.681±2.289	0.748	(φ) 5.57±2.781 (κ) 3.51±2.532	0.84
Ανήλικα (24d) φυσιολογικά (φ) σε σχέση με κάταγμα (κ)	(φ) 2.968±1.893 (κ) 3.196±2.786	0.435	(φ) 6.585±4.254 (κ) 7.751±6.192	0.355

*ΤΑ = Τυπική απόκλιση

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παρά το γεγονός ότι η πρώτη αναφορά στις καλπαΐνες χρονολογείται στο 1964, οικογένεια των καλπαϊνών φαίνεται να συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού, που αποτελεί μέχρι και σήμερα ένα ανεξάντλητο πεδίο έρευνας.

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο να μελετήσει την πιθανή συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των καλπαϊνών CAPN1 και CAPN2 με την πώρωση καταγμάτων, βασισμένη σε μελέτες που έχουν αποδείξει τη συσχέτισή τους με τη ρύθμιση της διαδικασίας της οστικής ανακατασκευής καθώς και στο συμπέρασμα ότι απώλεια της λειτουργίας των πρωτεασών αυτών σχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις οστών και οστεοπορωτικό φαινότυπο (Mosako et al, 2013, Murray S., et al, 1997).

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα οστών επίμυων με ή χωρίς κάταγμα τα οποία ομαδοποιήθηκαν βάσει της ηλικίας και του χρόνου ανάλυσης μετά το κάταγμα. Σε όλα τα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των καλπαϊνών CAPN1 και CAPN2 με τη μέθοδο ELISA.

Από την ανάλυση των μετρήσεων για τις παραπάνω ομάδες δειγμάτων δε φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των καλπαϊνών μεταξύ τους τουλάχιστον για τους συγκεκριμένους χρόνους μετά την πρόκληση κατάγματος.

4.2 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζει η περαιτέρω μελέτη για τον πλήρη προσδιορισμό της δράσης των καλπαϊνών στην πώρωση καταγμάτων. Στο επίπεδο των μελετών αυτών υπάρχει ανάγκη αναλύσεων με διευρυμένο δειγματοληπτικό εύρος, τόσο όσον αφορά τον αριθμό των δειγμάτων, όσο και τις χρονικές στιγμές (μετά την πρόκληση του κατάγματος) που θα πραγματοποιηθεί η ανάλυση.

Επιπλέον, θα ήταν χρήσιμο να μελετηθούν κατάγματα σε διαφορετικά είδη οστών (π.χ. σε βραχεία οστά). Ιδιαίτερη σημασία για την αποσαφήνιση του ρόλου αυτού θα είχε μια μελέτη ανάλυσης των καλπαϊνών σε πειραματόζωα πριν και μετά

από θεραπεία με αναστολείς του μονοπατιού RANKL/RANK/OPG, άρα αναστολή του μονοπατιού της οστεοκλαστογένεσης, π.χ. θεραπεία με χορήγηση denosumab. Μείωση της δράσης των καλπαϊνών σε πειραματόζωα μετά από τέτοιου είδους θεραπεία θα έδινε ένα πολύ αξιόπιστο αποτέλεσμα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Berg JM, Tymoczko JL Stryer L (2002) "Biochemistry" (5th ed.)
- Boyce, B. F., & Xing, L. (2008) "Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling". Archives of biochemistry and biophysics, 473(2), 139-146.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003) "Osteoclast differentiation and activation". Nature, 423(6937), 337-342.
- Bradford, MM. (1976) "A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Analytical Biochemistry 72:248-254. □
- Buckley, M., Collins, M., Thomas-Oates, J., & Wilson, J. C. (2009) "Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry". Rapid communications in mass spectrometry, 23(23), 3843-3854.
- Buckley, M., Kansa, S. W., Howard, S., Campbell, S., Thomas-Oates, J., & Collins, M. (2010) "Distinguishing between archaeological sheep and goat bones using a single collagen peptide". Journal of Archaeological Science, 37(1), 13-20.
- Cleland, T. P., Voegelé, K., & Schweitzer, M. H. (2012) "Empirical evaluation of bone extraction protocols". PloS one, 7(2), e31443.
- Craig, O. E., & Collins, M. J. (2002) "The removal of protein from mineral surfaces: implications for residue analysis of archaeological materials". Journal of Archaeological Science, 29(10), 1077-1082.
- Croall, D. E., and Ersfeld, K. (2007) "The calpains: modular designs and functional diversity" Genome Biol, 8(6), 218
- Dayton, W. R., & Schollmeyer, J. V. (1981). Immunocytochemical localization of a calcium-activated protease in skeletal muscle cells. Experimental cell research, 136(2), 423-433.
- Dayton, W. R., (1982). "Comparison of low-and high-calcium-requiring forms of the calcium-activated protease with their autocatalytic breakdown

products". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 709(2), 166-172.

- Dayton, W. R., Schollmeyer, J. V., Lepley, R. A., & Cortés, L. R. (1981). "A calcium-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Isolation of a low-calcium-requiring form of the protease" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 659(1), 48-61.
- Dobberstein, R. C., Collins, M. J., Craig, O. E., Taylor, G., Penkman, K. E. H., & Ritz-Timme, S. (2009) "Archaeological collagen: Why worry about collagen diagenesis?". *Archaeological and Anthropological Sciences*, 1(1), 31-42.
- Drake Richard (2010) "Gray's Anatomy for Students" 2nd Edition
- Ducy, P., Schinke, T., & Karsenty, G. (2000) "The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance". *Science*, 289(5484), 1501-1504.
- Fridriksson, E. K., Baird, B., & McLafferty, F. W. (1999) "Electrospray mass spectra from protein electroeluted from sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis gels" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10(5), 453-455.
- Gerstenfeld LC, Feng M, Gotoh Y, Glimcher MJ. (1994) "Selective extractability of noncollagenous proteins from chicken bone". *Calcif Tissue Int. Sep*;55(3):230-5.
- Goll D.E., Edmunds T., Kleese W. C., et al., "Some properties of the Ca^{2+} -dependent proteinase" *Prog. Clin. Biol. Res.*, 180, 151-164 (1985).
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. E. I., & Cong, J. (2003) "The calpain system" *Physiological reviews*, 83(3), 731-801.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. E. I., & Cong, J. (2003) "The calpain system" *Physiological reviews*, 83(3), 731-801.
- Greene, R. F., & Pace, C. N. (1974) "Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, α -chymotrypsin, and β -lactoglobulin". *Journal of Biological Chemistry*, 249(17), 5388-5393.
- Guroff G., (1964) "A Neutral, Calcium-activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain", *J. Biol. Chem.*, 239: 149-155

- Huston R. B., Krebs E. G., (1968) "Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by calcium ions. II. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme", *Biochemistry*, 7 (6), pp 2116–2122
- Ishiura S, Murofushi H, Suzuki K, Imahori K. 1978 "Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. I. Purification and characterization" (1978) *J Biochem.* Jul;84(1):225-30.
- Jiang, X., Ye, M., Jiang, X., Liu, G., Feng, S., Cui, L., & Zou, H. (2007) "Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis". *Journal of proteome research*, 6(6), 2287-2294.
- Johnson, P. (1990). Calpains (intracellular calcium-activated cysteine proteinases): structure-activity relationships and involvement in normal and abnormal cellular metabolism. *International Journal of Biochemistry*, 22(8), 811-822.
- Kapprell H.P., Goll D.E., (1989) "Effect of Ca^{2+} on binding of the calpains to calpastatin", *J Biol Chem.* Oct 25;264(30):17888-96
- Kapprell, H. P., &Goll, D. E. (1989). "Effect of Ca^{2+} on binding of the calpains to calpastatin" *Journal of Biological Chemistry*, 264(30), 17888-17896.
- Kastrykina T. and. Malysheva M. K (2000) "Calpain as One of the Calcium Signal Mediators in the Cell" *Neirofiziologiya/Neurophysiology*, Vol. 32, No. 2, pp. 142-156, March-April
- Key, L. L., Ries, W. L., Taylor, R. G., Hays, B. D., &Pitzer, B. L. (1990) "Oxygen derived free radicals in osteoclasts: the specificity and location of the nitrobluetetrazolium reaction". *Bone*, 11(2), 115-119.
- Kikuchi T, Yumoto N, Sasaki T, Murachi T. (1984) "Reconstitution of calpain I and calpain II from their subunits: interchangeability of the light subunits" *Arch BiochemBiophys.* Nov 1;234(2):639-45.
- Kim, D. H., & Vaccaro, A. R. (2006) "Osteoporotic compression fractures of the spine: current options and considerations for treatment". *The spine journal*, 6(5), 479-487.

- Kini, U., & Nandeesh, B. N. (2012). Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging* (pp. 29-57). Springer Berlin Heidelberg.
- Kishimoto A, Kajikawa N, Tabuchi H, Shiota M, Nishizuka Y. 1981 "Calcium-dependent neural proteases, widespread occurrence of a species of protease active at lower concentrations of calcium" *J Biochem. Sep*;90(3):889-92.
- Koichi Suzuki K., Shoji Hata S., Kawabata Y and Sorimachi H., (2004) "Structure, Activation, and Biology of Calpain", *Diabetes* 53.suppl 1 S12-S18.
- Koumura A, Nonaka Y, Hyakkoku K, Oka T, Shimazawa M, Hozumi I, Inuzuka T, Hara H (2008). "A novel calpain inhibitor, ((1S)-1((((1S)-1-benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-di-oxopropyl)amino)carbonyl)-3-methylbutyl) carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester, protects neuronal cells from cerebral ischemia-induced damage in mice". *Neuroscience* 157 (2): 309–18.
- Krebs E. G., Love D.S., Bratvold G. E., Kenneth A. Trayser K. A. , William L. Meyer W. I., , Fischer E. H., (1964) "Purification and Properties of Rabbit Skeletal Muscle Phosphorylase b Kinase" *Biochemistry*, 3 (8), pp 1022–1033
- Kupina NC, Nath R, Bernath EE, Inoue J, Mitsuyoshi A, Yuen PW, Wang KK, Hall ED (2001). "The novel calpain inhibitor SJA6017 improves functional outcome after delayed administration in a mouse model of diffuse brain injury". *J. Neurotrauma* 18 (11): 1229–40.
- Laemmli, UK. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227 (5259):680-685
- Lubisch W, Beckenbach E, Bopp S, Hofmann HP, Kartal A, Kästel C, Lindner T, Metz-Garrecht M, Reeb J, Regner F, Vierling M, Möller A (2003). "Benzoylalanine-derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: discovery of potent water-soluble calpain inhibitors with oral bioavailability". *J. Med. Chem.* 46 (12): 2404–12. doi:10.1021/jm0210717.
- Lutz Slomianka, School of Anatomy and Human Biology at The University of Western Australia.

- Madigan Michael T., Martinko John M., Stahl D., Clark David P., (2010) "Brock Biology of Microorganisms" (13th Edition)
- Mäkitie, O. (2013) "Causes, mechanisms and management of paediatric osteoporosis". *Nature Reviews Rheumatology*, 9(8), 465-475.
- McCarthy, J., Hopwood, F., Oxley, D., Laver, M., Castagna, A., Righetti, P. G., ..., & Herbert, B. (2003) "Carbamylation of Proteins in 2-D Electrophoresis Myth or Reality?". *Journal of proteome research*, 2(3), 239-242.
- McIlroy, B. K., Walters, J. D., Blackshear, P. J., & Johnson, J. D. (1991). Phosphorylation-dependent binding of a synthetic MARCKS peptide to calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, 266(8), 4959-4964.
- Melloni, E., & Pontremoli, S. (1989). The calpains. *Trends in neurosciences*, 12(11), 438-444.
- Murachi, T., Murakami, T., Ueda, M., Fukui, I., Hamakubo, T., Adachi, Y., & Hatanaka, M. (1989) "The calpain-calpastatin system in hematopoietic cells" *Calcium Protein Signaling* (pp. 445-454). Springer US.
- Nimmrich V, Reymann KG, Strassburger M, Schöder UH, Gross G, Hahn A, Schoemaker H, Wicke K, Möller A (2010). "Inhibition of calpain prevents NMDA-induced cell death and beta-amyloid-induced synaptic dysfunction in hippocampal slice cultures". *Br. J. Pharmacol.* 159 (7): 1523–31.
- Nishiura I, Tanaka K, Yamato S, Murachi T, (1978) "The occurrence of an inhibitor of Ca^{2+} -dependent neutral protease in rat liver" *J Biochem.* 1978 Dec 84(6):1657-9
- Nordin, B.E.C. (1971) "Clinical significance and pathogenesis of osteoporosis". *BMJ*, 1(5749), 571-576.
- Otsuka Y, Goll D.E., (1987) "Purification of the Ca^{2+} -dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca^{2+} -dependent proteinase", *J Biol Chem.* Apr 25;262(12):5839-51
- Pageau, S. C. (2009, May) "Denosumab", *MAbs* (Vol. 1, No. 3, pp. 210-215).
- Pontremoli S. and Melloni E., (1986). "Extralyosomal protein degradation," *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 455-481

- Raisz, L. G. (2005) "Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects". *Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3318
- Raisz, L. G. (2005) "Screening for osteoporosis" *New England Journal of Medicine*, 353(2), 164-171.
- Reville W. J., Goll D. E., Stromer M. H., Robson R. M., & Dayton, W. R. (1976). "A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Subcellular localization of the protease in porcine skeletal muscle" *The Journal of cell biology*, 70(1), 1-8.
- Riggs, B. L., Wahner, H. W., Seeman, E., Offord, K. P., Dunn, W. L., Mazess, R. B. & Melton III, L. J. (1982) "Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging: differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes". *Journal of Clinical Investigation*, 70(4), 716
- Robyt, John F.; White, Bernard J. (1990) "Biochemical Techniques: Theory and Practice"
- Saido T. C., Sorimachi H., and Suzuki K. (1994). "Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement" *The FASEB Journal*, 8(11), 814-822.
- Saido, T. C., Sorimachi, H., & Suzuki, K. (1994). "Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement" *The FASEB Journal*, 8(11), 814-822.
- Schapira, D., & Schapira, C. (1992) "Osteoporosis: the evolution of a scientific term" *Osteoporosis International*, 2(4), 164-167.
- Scinner H.C.W., (1987) "Bone: mineralization", *The Scientific Basis of Orthopaedics*, Albright J. A. and Brand R. A. (edit.), Appleton and Lange Press, Los Altos, CA
- Sevitt, S. (1981) "Bone repair and fracture healing in man". Churchill Livingstone.
- Sheth, R. D. (2002). Bone health in epilepsy. *Epilepsia*, 43(12), 1453-1454.
- Slack J. M. W. 2007 "Essential Developmental Biology", 2nd Edition

- Sorimachi H, Hata S, Ono Y, (2011) "Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization", *ProcJpnAcadSer B PhysBiol Sci.* 87(6):287-327
- Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, Sasagawa N, Sorimachi N, Shimada H, Tagawa K, Maruyama K, et al., (1995) "Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence", *J Biol Chem.* Dec 29;270(52):31158-62
- Sorimachi H., Shoji H., Ono Y., (2011) "Impact of genetic insights into Calpain biology" *JB Review*
- Sorimachi H., Tsukahara T., Okada-Ban M., Sugita H., Ishiura S., Suzuki K., (1995) "Identification of a third ubiquitous calpain species--chicken muscle expresses four distinct calpains" *Biochim Biophys Acta.* Apr 26;1261(3):381-93
- Sorimachi H., Tsukahara T., Okada-Ban M., Sugita H., Ishiura S., Suzuki K., (1995) "Identification of a third ubiquitous calpain species--chicken muscle expresses four distinct calpains" *BiochimBiophysActa.* Apr 26;1261(3):381-93
- Sorimachi, H., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J*, 328, 721-732.
- Stevens Alan and Lowe James S. (2004) "Human Histology"
- Sugita H., Ishiura Sh., Kamakura K., et al., (1984) "Ca-activated neural protease in physiological and pathological conditions," in: *Calcium Regulation in Biological Systems*, Takeda Sci. Found., Tokyo pp. 243-256
- Sugita H., Ishiura Sh., Kamakura K., et al., (1984), "Ca-activated neural protease in physiological and pathological conditions " *Calcium Regulation in Biological Systems*, Takeda Sci. Found., Tokyo pp. 243-256.
- Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H. (2004) "Structure, activation, and biology of calpain", *Diabetes.* Feb. 53 Suppl 1:S12-8
- Suzuki K., Imajoh S., Emori Y., et al., (1987). "Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor. Activation at the cell membrane and biological function" *FEBS Lett.*, 220, No. 2, 271-277

- Suzuki, K., Sorimachi, H., Yoshizawa, T., Kinbara, K., & Ishiura, S. (1995). Calpain: novel family members, activation, and physiological function. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, 376, 523-523
- Vaz, M. F., Canhão, H., & Fonseca, J. E. (2011) "Bone: a composite natural material" INTECH Open Access Publisher.
- Wang K.K., Nath R, Posner A, Raser KJ, Buroker-Kilgore M, Hajimohammadreza I, Probert A W, Marcoux FW, Ye Q, Takano E, Hatanaka M, Maki M, Caner H, Collins JL, Fergus A, Lee KS, Lunney EA, Hays SJ, Yuen P (1996). "An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (13): 6687–92.
- Waxman, L., & Krebs, E. G. (1978). "Identification of two protease inhibitors from bovine cardiac muscle." *Journal of Biological Chemistry*, 253(17), 5888-5891.
- Weiner, S., & Wagner, H. D. (1998) "The material bone: structure-mechanical function relations" *Annual Review of Materials Science*, 28(1), 271-298.
- White V (1999) "Biochemical Storm' Following Brain Trauma An Important Factor In Treatment, University of Florida Researcher Finds". *University of Florida News*. Retrieved 2010-08-07
- World Health Organization (Ed.). (2003). *Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific group (No. 921)*. Diamond Pocket Books (P) Ltd..
- www.visiblebody.com, understanding anatomy in real 3D
- Yoshimura N, Tsukahara I, Murachi T. *Biochem J.* (1984) "Calpain and calpastatin in porcine retina. Identification and action on microtubule-associated proteins" *Oct* 1;223(1):47-51.
- Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S. and Suzuki, K. (1995) Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Calcium ions. II. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme *Biochemistry*, 7 (6), pp 2116–2122

- Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S. and Suzuki, K. (1995)
“Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca^{2+} ions. II.
Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme”
Biochemistry, 1968, 7 (6), pp 2116–2122